

PARTIÇÃO DA ATIVIDADE DA REDUTASE DO
NITRATO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE
PLÂNTULAS DE SOJA (*Glycine max* L. MERR)

Maria Luiza Carvalho Carelli

Orientador: DR. ANTONIO CELSO NOVAES DE MAGALHÃES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Grau de Mestre em "Solos e Nutrição de Plantas".

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
agosto de 1979

À

Laura e Armando

Gi e Lúcio

Paula

Rafaela

Gustavo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães, pela excelente orientação e constante estímulo durante o transcorrer do presente trabalho;

Ao Prof. Luiz Gonzaga Santoro, pelas sugestões e orientação na metodologia utilizada;

À Norma da Silva Casau, pela colaboração nas determinações analíticas;

À Maria Ester Godoy Pereira, pelo esmero na datilografia;

Ao Pesquisador Científico Antonio Roque Dechen, pela cooperação na fase de impressão deste trabalho;

Ao Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo, pelas facilidades oferecidas para a realização desta pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Pesquisador concedida;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Indução da redutase do nitrato pelo nitrato	5
3.2. Efeito da luz na atividade da redutase do nitrato.	7
3.3. Influência da idade da folha na atividade da redutase do nitrato	10
3.4. Efeito de inibidores da síntese de proteínas na indução da redutase do nitrato	12
3.5. Determinação da redutase do nitrato "in vivo" e "in vitro"	16
3.6. Efeito da remoção dos cotilédones no desenvolvimento das plantas	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Condição de germinação e crescimento das plântulas	20
4.2. Atividade da enzima redutase do nitrato	21
4.3. Análise de clorofila	22
4.4. Atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones	22
4.5. Efeito de inibidores da síntese de proteínas na indução da atividade da redutase do nitrato em cotilédones	23
4.6. Dinâmica da partição da atividade da enzima redutase do nitrato durante a fase inicial de desenvolvimento das plantas	24
4.7. Efeito dos níveis de nitrato das soluções nutritivas na atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas primárias	25
4.8. Efeito da remoção dos cotilédones na atividade da enzima redutase do nitrato e no desenvolvimento das plântulas	25

	Página
4.8.1. Atividade da enzima redutase do nitrato ...	26
4.8.2. Desenvolvimento das plântulas	26
4.8.2.1. Matéria seca dos cotilédones	27
4.8.2.2. Altura e matéria seca do caule ...	27
4.8.2.3. Área foliar e matéria seca das fo- lhas primárias e primeira folha trifoliolada	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Atividade da enzima redutase do nitrato em cotilê- dones	29
5.2. Efeito de inibidores da síntese de proteínas na in- dução da atividade da redutase do nitrato nos coti- lédones	32
5.3. Partição da atividade da enzima redutase do nitra- to durante a fase inicial de desenvolvimento da planta	35
5.4. Efeito dos níveis de nitrato das soluções nutriti- vas na atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas primárias	38
5.5. Efeito da remoção dos cotilédones na atividade da enzima redutase do nitrato e no desenvolvimento das plântulas	40
5.5.1. Atividade da enzima redutase do nitrato ...	40
5.5.2. Desenvolvimento das plântulas	45
5.5.2.1. Matéria seca dos cotilédones	45
5.5.2.2. Altura e matéria seca do caule ...	45
5.5.2.3. Área foliar e matéria seca das fo- lhas primárias e primeira folha trifoliolada	49
6. DISCUSSÃO	53
6.1. Atividade da enzima redutase do nitrato em cotilê- dones	53

	Página
6.2. Dinâmica da partição da atividade da redutase do nitrato durante a fase inicial de desenvolvimento das plantas	58
6.3. Efeito dos níveis de nitrato das soluções nutritivas na atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas primárias	60
6.4. Efeito da remoção dos cotilédones na atividade da enzima redutase do nitrato e no desenvolvimento das plântulas	62
7. CONCLUSÕES	65
8. SUMMARY	67
9. LITERATURA CITADA	69

1. RESUMO

O processo de aparecimento e manutenção da atividade da enzima redutase do nitrato, "in vivo", foi determinado em plântulas de soja, cultivadas em vermiculita, em temperatura constante e sob luz contínua. A atividade enzimática foi detectada nos cotilédones após aproximadamente 20 horas de exposição à luz contínua, e foi proporcional às concentrações de nitrato nas soluções de irrigação. O valor máximo de atividade foi obtido após 120 horas de iluminação, nos cotilédones das plântulas que receberam solução 15 mM de nitrato. As curvas referentes à acumulação de clorofila e atividade da redutase do nitrato nos cotilédones seguiram o mesmo padrão, indicando que ambos os eventos foram relacionados com o desenvolvimento de intensa atividade anabólica. A atividade da redutase do nitrato nos cotilédones foi inibida pela cicloheximida, mas não pela actinomicina D, sugerindo que a atividade enzimática depende da síntese de proteína "de novo", mas não da síntese de RNA.

A fase de aumento da atividade da enzima nas folhas primárias coincidiu com a fase de máxima atividade nos cotilédones. O mesmo fenômeno foi observado na etapa seguinte de crescimento, na qual o decréscimo da atividade da redutase do nitrato nas folhas primárias foi acompanhado do aumento da atividade na primeira folha trifoliolada.

A atividade enzimática foi baixa nas folhas em início de expansão, atingiu valores máximos em folhas quase que totalmente expandidas, e declinou posteriormente com a idade. As determinações das atividades máximas da redutase do nitrato, quando efetuadas com a infiltração de nitrato nos tecidos, foram cerca de 2,3, 3,2 e 2,2 vezes maiores do que as análises sem nitrato no meio de reação, para os cotilédones, folhas primárias e primeira folha trifoliolada, respectivamente.

A remoção dos 2 cotilédones, 24 horas após a emergência das plântulas, provocou decréscimos de 78 e 75% na acumulação de matéria seca e na área das folhas primárias, após 240 horas de luz contínua. Houve um atraso de 72 horas no início da expansão das folhas primárias e a primeira folha trifoliolada não se desenvolveu até o término do experimento. O desenvolvimento do caule também foi prejudicado pela remoção dos 2 cotilédones, ocorrendo decréscimos de 62 e 81% na altura e no peso da matéria seca, após 336 horas de luz contínua.

A retirada de 1 cotilédone afetou em menor proporção os parâmetros considerados, ocasionando reduções de 20 e 21% na produção de matéria seca e na área das folhas primárias, após 240 horas de luz contínua. O desenvolvimento da primeira folha trifoliolada foi pouco alterado pela remoção de 1 cotilédone, e não houve defasagem na expansão das folhas primárias, quando comparadas com o controle. A altura e o peso da matéria seca do caule das plântulas com 1 cotilédone, apresentaram reduções de 14 e 29%, após 336 horas de luz contínua.

As atividades máximas da redutase do nitrato, expressas em μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1}$ por folha, nas folhas primárias das plântulas com 1 e 2 cotilédones removidos, foram, respectivamente, 65 e 9% da atividade enzimática das plântulas intactas.

2. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é considerado como o quarto elemento mais abundante na composição das plantas, depois do carbono e dos elementos da água, fazendo parte da estrutura dos aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e coenzimas (EPSTEIN, 1972).

As plantas de soja apresentam flexibilidade para preencher suas necessidades de nitrogênio, devido ao duplo sistema de assimilação que elas possuem. Em um dos sistemas, íons nitrato ou amônia podem ser absorvidos do solo, transportados através da planta na forma de nitrato ou aminoácidos, e incorporados em proteínas após a redução do nitrato e síntese de aminoácidos, nos órgãos clorofilados. No segundo sistema, ocorre a fixação simbiótica de nitrogênio nos nódulos das raízes, seguida de incorporação em aminoácidos, que são fornecidos para a parte aérea onde são convertidos em proteínas (STREETER, 1972.b). A parcela com que cada um desses processos contribui para o crescimento e produtividade da soja varia com a fase de desenvolvimento da planta e com os fatores ambientais, principalmente no que se refere ao teor de nitrogênio do solo (STREETER, 1972.a). Embora os dois sistemas possam trabalhar em paralelo, a nutrição nitrogenada das plantas até a fase de florescimento parece ser mais dependente da assimilação do nitrato, sendo que do florescimento até a maturidade a fixação do nitrogênio é o processo dominante (STREETER,

1972.a,b). As plantas completamente dependentes da fixação simbiótica não recebem quantidades substanciais de nitrogênio até aproximadamente quatro semanas após a germinação. Assim, o fornecimento inicial de nitrogênio mineral capacita as plantas a manter uma taxa de crescimento razoável, permitindo que os nódulos se desenvolvam mais rapidamente (SHIBLES *et alii*, 1975). É estimado que cerca de 50% do nitrogênio total da planta provém da absorção e subsequente redução do nitrato, via redutase do nitrato (HARPER *et alii*, 1972).

O processo de assimilação do nitrato é de grande importância para o crescimento da planta porque é o principal composto nitrogenado inorgânico absorvido pelas raízes. De fato, o nitrato é a forma de nitrogênio mais comumente absorvida pelas plantas cultivadas; as formas reduzidas de nitrogênio, presentes no solo ou aplicadas como fertilizantes, sofrem rápida nitrificação em solos agriculturáveis (MAGALHÃES, 1975).

Na via de assimilação do nitrato, as duas primeiras reações, catalizadas pelas enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, respectivamente, são controladas pela redutase do nitrato que é considerada a enzima limitante na incorporação do nitrogênio mineral em compostos orgânicos (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

Os objetivos deste trabalho foram: a) estudar a partição da atividade da enzima redutase no nitrato durante o processo de desenvolvimento de cotilédones, folhas primárias e primeira folha trifoliolada de plantas de soja; b) determinar o início do processo de redução do nitrato em sementes de soja em germinação, bem como verificar o efeito de inibidores da síntese de proteínas na atividade da redutase do nitrato; c) verificar o efeito da remoção dos cotilédones na atividade da redutase do nitrato e no desenvolvimento inicial das plantas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Um fato característico do metabolismo do nitrato em plantas superiores refere-se à sua modulação pelas variações das condições ambientais. Alterações da intensidade luminosa, disponibilidade de água, nutrição mineral, tratamento hormonal, idade e constituição genética da planta, influenciam a capacidade de redução do nitrato. Na maioria dos casos, o controle do processo de redução do nitrato é efetuado através da enzima redutase do nitrato.

3.1. Indução da redutase do nitrato pelo nitrato

As primeiras evidências da indução da atividade da redutase do nitrato pelo nitrato em plantas superiores foram obtidas por HEWITT *et alii*, 1956 (citado por HEWITT *et alii*, 1976) e CANDELLA *et alii* (1957), que demonstraram que a atividade da enzima, obtida de plantas de couve-flor, estava relacionada com a fonte de nitrogênio utilizada para o crescimento das plantas. Aquelas que receberam nitrato apresentavam maior atividade enzimática do que as plantas que foram colocadas para absorver sulfato de amônio. Trabalhos independentes efetuados por TANG e WU (1957), em plântulas de arroz, e por RIJVEN (1958) em embriões destacados de *Capsella* e trigo, mostraram que tecidos de plantas, ou embriões, cultivados em ausência de nitrato, não apresentavam atividade da redutase do nitrato.

Posteriormente, foi confirmada a indução da redutase do nitrato pelo nitrato, em plantas de diferentes espécies (HEWITT e AFRIDI, 1959; HAGEMAN e FLESHER, 1960; AFRIDI e HEWITT, 1964; BEEVERS *et alii*, 1965).

A quantidade de nitrato requerida para indução da redutase do nitrato varia de espécie para espécie e, em alguns casos, altas concentrações são necessárias. Essas diferenças provavelmente indicam diferenças na taxa de absorção de nitrato característica das várias espécies (BEEVERS e HAGEMAN, 1969). EVANS e NASON (1953) constataram que a concentração de nitrato necessária para saturar a enzima extraída de folhas primárias de plântulas de soja, foi equivalente a 20 mM.

HAGEMAN e FLESHER (1960) observaram, em estudos efetuados em casa de vegetação, que a atividade da redutase do nitrato era associada com a concentração de nitrato presente na solução nutritiva. Plantas de milho que cresceram em meio contendo 3,8 mM de nitrato apresentavam-se cloróticas, atrofiadas e com baixa atividade enzimática, enquanto que aquelas que receberam 15 mM de nitrato (solução de Hoagland) apresentaram ótimo desenvolvimento e alta atividade da redutase do nitrato.

AFRIDI e HEWITT (1964) mostraram que a atividade da redutase do nitrato nas folhas variava com a concentração de nitrato da solução nutritiva fornecida diariamente às plantas de couve-flor. Os valores máximos de atividade enzimática foram obtidos com a concentração de nitrato correspondente a 12 mM.

BEEVERS *et alii* (1965) verificaram, em cotilédones destacados de plântulas de rabanete, que a concentração ótima de nitrato para a indução da redutase do nitrato foi 10 mM. Maiores concentrações de nitrato inibiram o processo de indução da atividade da enzima. Em plântulas de milho, a concentração ótima de nitrato foi maior do que aquela requeri-

da para cotilédones de rabanete.

É geralmente aceito que a indução da atividade da redutase do nitrato, em resposta ao seu substrato nitrato, envolve principalmente a síntese de proteína "de novo" ao invés da ativação de proteína pré-existente ou pró-enzima (HEWITT e AFRIDI, 1959; AFRIDI e HEWITT, 1965; BEEVERS *et alii*, 1965; INGLE *et alii*, 1966, 1968.a; SMITH e THOMPSON, 1971. a; e ZIELKE e FILNER, 1971). A prova mais convincente foi fornecida pelos experimentos efetuados por ZIELKE e FILNER (1971), em cultura de células de fumo, que confirmaram que a atividade da redutase do nitrato, induzida pelo nitrato, envolve a síntese "de novo" da proteína. Entretanto, esse critério de indução deve ser cuidadosamente aplicado, pois VEGA *et alii* (1971) mostraram que, em *Chlorella*, o nitrato não foi essencial para a síntese "de novo" do complexo da enzima redutase do nitrato.

3.2. Efeito da luz na atividade da redutase do nitrato

A luz é um importante fator na indução e manutenção da atividade da redutase do nitrato em tecidos vegetais. A atividade da enzima apresenta variação diária influenciada pela intensidade luminosa (HAGEMAN *et alii*, 1961; SANDERSON e COCKING, 1964; BEEVERS *et alii*, 1965). As inter-relações entre a luz e a assimilação do nitrato são bastante complexas e nem sempre perfeitamente interpretadas pelos vários autores.

EVANS e NASON (1953) observaram baixa atividade da redutase do nitrato em extratos de plantas de soja submetidas a períodos de ausência de luz. Os autores sugeriram que a disponibilidade limitada de nucleotídeos de piridina reduzidos, provenientes direta ou indiretamente da fotossíntese, se constitua no fator causal do decréscimo da atividade da redutase do nitrato nas folhas.

HAGEMAN e FLESHER (1960) constataram que extratos de folhas de plantas sombreadas apresentavam menor ativi-

dade da redutase do nitrato do que aqueles obtidos de plantas totalmente iluminadas. Também foi observado em plantas de milho, transferidas da luz para o escuro, a ocorrência de um decréscimo progressivo na atividade da enzima que foi restabelecida por iluminação subsequente. Como no meio de determinação da enzima havia quantidade suficiente de nucleotídeo de piridina reduzido, foi sugerido que o papel da luz na indução da redutase do nitrato não estava correlacionado diretamente com a produção do "poder redutor".

BEEVERS *et alii* (1965) concluíram que o efeito da luz na indução da redutase do nitrato, em cotilédones de rabanete e plântulas de milho, manifestava-se de maneira indireta, devido ao aumento da absorção de nitrato associado a maior permeabilidade do tecido. Entretanto, em folhas de plantas de aveia e cevada que cresceram no escuro, a presença de nitrato não ocasionou a indução da enzima acima do baixo nível endógeno, sendo que o desencadeamento do processo somente ocorreu após a iluminação (CHEN e RIES, 1969; TRAVIS *et alii*, 1969). TRAVIS *et alii* (1970.b), ao eliminarem o problema da absorção de nitrato como variável experimental, concluíram que o nitrato e a luz se constituíam em fatores independentemente necessários para adequada indução da redutase do nitrato em folhas de plantas de cevada.

KANNANGARA e WOOLHOUSE (1967) indicaram que a indução da redutase do nitrato em folhas de *Perilla* requer diretamente a fixação fotossintética de CO₂. Esses resultados foram confirmados por SAWHNEY e NAIK (1972), que constataram que a ausência de CO₂ inibiu severamente a síntese da enzima em plântulas de arroz, na presença de luz. Os resultados obtidos por KANNANGARA e WOOLHOUSE (1967) e por SAWHNEY e NAIK (1972) mostraram que o fornecimento de glicose exógena não pode substituir o CO₂ na síntese da enzima redutase do nitrato na luz.

JORDAN e HUFFAKER (1972) observaram que a indução da redutase do nitrato, em folhas de plântulas de cevada, acompanhou o desenvolvimento da fixação fotossintética de CO_2 . Os autores sugeriram que os produtos fotossintéticos poderiam ser necessários para a indução de níveis significativos de atividade da enzima, mas não eliminaram outros possíveis efeitos da luz. Posteriormente, ASLAM *et alii* (1973) observaram que o fornecimento de glicose retardou consideravelmente a perda de atividade da redutase do nitrato; que ocorre quando plântulas de cevada são colocadas no escuro. Os autores sugeriram que um dos principais efeitos da luz na indução da atividade da redutase do nitrato, poderia estar relacionado com o fornecimento de produtos da fotossíntese, que seriam utilizados pela respiração que, por sua vez, comandaria o processo de indução.

TRAVIS *et alii* (1970.a) e TRAVIS e KEY (1971), reportaram que o papel da luz estaria mais diretamente associado com o desenvolvimento e manutenção do sistema de síntese protéica, ao nível de atividade dos polirribosomas, do que envolvida especificamente na indução da redutase do nitrato. BEEVERS (1976.a) concluiu que a explicação mais aceitável para o efeito da luz na atividade da enzima redutase do nitrato seria o aumento na capacidade de síntese de proteína. Deste modo, a iluminação não seria responsável pela indução da redutase do nitrato; o aumento da síntese de proteína ocasionaria o aumento da capacidade de expressão do efeito indutivo do substrato nitrato (BEEVERS, 1976.a).

SLUITERS-SCHOLTEN (1975), em estudos efetuados com folhas de plântulas de feijão, sugeriu que o NADH indiretamente formado através da fotossíntese atuaria como fator regulador da atividade da redutase do nitrato.

3.3. Influência da idade da folha na atividade da redutase do nitrato

Durante a vida da planta, com o desenvolvimento sucessivo das folhas, cada uma delas apresenta demanda e contribuição específicas para com o resto da planta. A capacidade de síntese da folha se altera profundamente durante o seu desenvolvimento (PATE, 1968).

A indução da redutase do nitrato, em resposta a indutores, está relacionada com a idade dos tecidos. EVANS e NASON (1953) verificaram que a quantidade de redutase do nitrato presente nas folhas primárias de plântulas de soja de 8 dias foi bem mais elevada do que em plântulas de 17 dias. Nas últimas, a enzima se concentrou nos tecidos jovens, metabolicamente ativos.

HAGEMAN e FLESHER (1960) observaram que a atividade da redutase do nitrato, na parte aérea de plântulas de milho, decresceu com a idade, em variadas condições ambientais.

ZIESERL *et alii* (1963) constataram que houve pouco efeito da posição ou idade da folha na atividade da redutase do nitrato e teor de proteínas, em folhas de plantas de milho cultivadas no campo. Esses resultados não concordaram com os dados obtidos em câmara de crescimento, onde ocorreram sensíveis decréscimos na atividade da enzima com o aumento da idade da folha.

AFRIDI e HEWITT (1964), estudando a redutase do nitrato em plantas de couve-flor, verificaram que a atividade da enzima nas folhas atingiu um pico máximo, declinando acentuadamente em tecidos mais velhos, tanto em plantas crescidas em nitrato como em amônia. Os mesmos autores constataram que as atividades foram mais baixas na primeira ou segunda folha e em folhas jovens ainda nos primeiros estádios de expansão.

WALLACE e PATE (1965) estudaram a atividade da

enzima em folhas de diferentes idades de plantas *Pisum arvense* cultivadas em constante suprimento de nitrato. As análises demonstraram que a enzima foi mais ativa justamente quando a folha estava totalmente expandida, diminuindo acentuadamente logo a seguir.

INGLE *et alii* (1966) verificaram que a resposta da atividade da redutase do nitrato, em cotilédones destacados de plântulas de rabanete, à incubação durante 4 horas com nitrato exógeno, variou de acordo com as condições de crescimento e idade das plantas. A incubação de cotilédones destacados de plântulas de 3 ou 4 dias produziu um grande aumento na atividade da enzima redutase do nitrato, ocorrendo decréscimos lineares na atividade induzida naqueles tecidos, nos dias subsequentes.

KANNANGARA e WOOLHOUSE (1967) observaram que a idade da planta afetou significativamente o nível induzido de redutase do nitrato em folhas de *Perilla frutescense*, nas quais a atividade da enzima em folhas senescentes foi somente 32% das folhas não completamente expandidas.

HARPER e HAGEMAN (1972) estudaram a atividade da redutase do nitrato em folhas de soja, em condições de campo e em sistemas de culturas hidropônicas ao ar livre. Os autores constataram que a atividade média, por grama de peso de matéria fresca por hora, da copa inteira da planta, foi mais alta na fase de plântula, enquanto que a atividade total, por grama de peso de matéria fresca por hora, vezes o total de área foliar, atingiu o máximo quando as plantas estavam no período de desenvolvimento compreendido entre o florescimento total e a fase de meio enchimento das vagens. A atividade da redutase do nitrato foi mais alta na folha mais apical, imediatamente antes da expansão total, e declinou nas folhas mais baixas da copa da planta, em fases posteriores de desenvolvimento.

HARPER *et alii* (1972) obtiveram resultados aná-

logos aos descritos acima. Deste modo, a atividade da redutase do nitrato, por hora por folha, em 16 variedades de soja, foi mais elevada nas folhas mais superiores da planta, nos vários estádios de crescimento, até ao da vagem meio cheia. A atividade da redutase do nitrato, por grama por hora, considerando todas as folhas, foi mais alta nas fases iniciais de desenvolvimento, declinando com a maturação da planta. Por outro lado, a atividade total da planta foi máxima na época do florescimento total.

FAIR *et alii* (1973) observaram que a atividade da redutase do nitrato variou com a idade e posição das folhas no axis principal de plantas de cevada, seguindo um padrão irregular, mas decresceu nitidamente no decorrer da maturação e senescência dos tecidos.

SCHRADER *et alii* (1974), em estudos realizados com plantas de milho, aveia e fumo, verificaram que a idade das folhas influenciou o nível de atividade e a taxa de decaimento da redutase do nitrato, sendo que a instabilidade da enzima aumentou com a idade das folhas.

SRIVASTAVA (1975) determinou a atividade da redutase do nitrato em folhas de plantas de feijão em diferentes idades. A atividade da enzima em folhas muito jovens foi baixa, atingindo valores máximos após 10 e 11 dias de crescimento das plantas, decaindo logo a seguir.

3.4. Efeito de inibidores da síntese de proteínas na indução da redutase do nitrato

A cicloheximida, também denominada actidiona, é um antibiótico isolado do fungo *Streptomyces griseus*. KERRIDGE, em 1958, mostrou que esta substância inibiu a incorporação de glicina e a síntese de proteína em levedura. Resultados análogos foram obtidos por MORRIS (1966), em estudos efetuados em *Chlorella*.

SIEGEL e SISLER (1963) verificaram que a cicloheximida inibiu a incorporação de leucina em ribosomas de leveduras, e HAIDLE e STORCK (1966) observaram efeito semelhante na incorporação de fenilalanina em proteínas de *Mucor rouxií*. Ambos os grupos concluíram que a ação da cicloheximida foi impedir a transferência dos aminoácidos do complexo RNA solúvel-aminoácido para a cadeia de polipeptídeos.

A síntese de RNA dependente de DNA, catalizada pela RNA polimerase, é inibida especificamente pelo antibiótico actinomicina D, que se associa com os resíduos de guanina do DNA (LEHNINGER, 1970). Conseqüentemente, a síntese de proteínas também será inibida.

A cicloheximida e a actinomicina D, bem como outros antibióticos, têm sido intensamente utilizados para elucidar certos aspectos dos processos metabólicos e fisiológicos que envolvem, direta ou indiretamente, a síntese de proteínas.

HEWITT e AFRIDI (1959) estudaram a natureza adaptativa da enzima redutase do nitrato em folhas de plantas de couve-flor e mostarda, em resposta ao molibdênio e nitrato. Através do uso de vários antimetabólitos, inclusive a cicloheximida, os autores concluíram que a síntese de proteína estava envolvida na indução da atividade da redutase do nitrato.

BEEVERS *et alii* (1965) demonstraram que a indução da atividade da redutase do nitrato, em cotilédones de rabanete e em folhas de plântulas de milho, foi reduzida por inibidores de síntese de proteínas, entre os quais se incluía a actinomicina D. Os autores concluíram que a indução da redutase do nitrato, em resposta ao substrato, requer a síntese "de novo", ao invés de ativação de proteína já existente ou pró-enzima.

AFRIDI e HEWITT (1965) testaram o efeito de uma ampla faixa de antimetabólitos naturais e sintéticos na ativi-

idade da redutase do nitrato em folhas de plantas de couve-flor. A cicloheximida foi um dos compostos que apresentou maior inibição, em todas as concentrações usadas, que variaram de 6 a 5000 $\mu\text{g/ml}$.

INGLE *et alii* (1966) observaram que a indução das enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, em cotilédones destacados de plantas de rabanete, foi inibida por actinomicina D (20 $\mu\text{g/ml}$), cicloheximida (2 $\mu\text{g/ml}$) e puromicina (200 $\mu\text{g/ml}$), mesmo na presença de nitrato, indicando que o processo exigiu síntese de proteína e RNA.

HEWITT *et alii* (1967), usando tecidos de couve-flor deficientes em nitrato, verificaram que a cicloheximida, à uma concentração de 150 $\mu\text{g/ml}$, infiltrada juntamente com o nitrato, causou uma inibição de 50% na indução da redutase do nitrato após 6 horas, e 75% após 22 horas de incubação. O efeito da concentração da cicloheximida foi pouco significativo na determinação da intensidade de inibição da enzima.

SCHRADER *et alii* (1968) constataram em plântulas de milho que a cicloheximida (50 $\mu\text{g/ml}$) ocasionou a diminuição da atividade ou a inativação das enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito. A atividade da redutase do nitrato decresceu de 10 para 0,8 μ moles de NO_2^- por grama de peso de matéria fresca por hora, após 15 horas de incubação em meio contendo nitrato e cicloheximida.

INGLE (1968) utilizando cicloheximida, actinomicina D e puromicina, constatou que a indução da redutase do nitrato, em cotilédones destacados de plântulas de rabanete, requer a síntese de proteínas e RNA. A cicloheximida inibiu 99% a indução da enzima, enquanto que o tratamento dos cotilédones com actinomicina D resultou em aproximadamente 90% de inibição de todos os componentes dos ácidos nucleicos.

ELLIS e MACDONALD (1970) verificaram que a ci-

cicloheximida (1 µg/ml) inibiu a absorção de íons inorgânicos em tecidos não clorofilados de várias espécies de plantas. Entretanto, em folhas o inibidor não produziu efeito, o que levou os autores a concluir que a cicloheximida pode afetar outros aspectos do metabolismo celular além da síntese de proteínas.

SMITH e THOMPSON (1971.a) utilizaram inibidores de síntese de RNA e proteínas (actinomicina D, cicloheximida e puromicina) para verificar se a síntese de proteínas poderia estar envolvida no aumento da atividade da redutase do nitrato, que ocorre durante a incubação de raízes de cevada na presença de nitrato. Os autores sugeriram que a síntese de proteína "de novo", mais do que a ativação de proteína pré-existente, é necessária para a indução da redutase do nitrato desse tecido.

SMITH e THOMPSON (1971.b), em trabalho análogo ao descrito acima, constataram que provavelmente a síntese "de novo" de RNA mensageiro e de proteínas está associada com a indução da redutase do nitrato que ocorre em *Chlorella vulgaris*.

SAWHNEY e NAIK (1972) utilizaram a cicloheximida para estudar o efeito da luz na síntese da redutase do nitrato em plântulas de arroz. Os resultados indicaram que a síntese de proteínas foi essencial para a produção de redutase do nitrato na luz, não envolvendo a ativação de enzimas ou seus precursores.

JACKSON *et alii* (1973) verificaram que a actinomicina D (20 µg/ml) e a cicloheximida restringiram a absorção de nitrato, bem como inibiram a indução da redutase do nitrato no segmento apical de raízes de plantas de milho.

SAWHNEY e NAIK (1973) estudaram, em folhas de plantas de arroz, a síntese da redutase do nitrato através do uso de cicloheximida e cloranfenicol. Contudo, a síntese da

redutase do nitrato não foi afetada por cloranfenicol, mas sim pela cicloheximida, sugerindo que a enzima é sintetizada nos ribosomas citoplasmáticos.

SLUITERS-SCHOLTEN (1973) também constatou que a indução da redutase do nitrato, pelo nitrato, em folhas verdes de plantas de feijão crescidas na luz, foi inibida pela cicloheximida, mas não pelo cloranfenicol.

RADIN (1974) observou que durante os primeiros dois dias de germinação de sementes de algodão, a indução da redutase do nitrato pelo nitrato foi quase que completamente abolida pela cicloheximida, mas não foi afetada por inibidores de síntese de RNA (actinomicina D). Os resultados sugeriram que a enzima não foi sintetizada como resultado da síntese de RNA, dependente de DNA. Entretanto, a forte inibição causada pela cicloheximida implicou em síntese de proteína "de novo" durante a indução.

RADIN e TRELEASE (1976) constataram que a indução da atividade da redutase do nitrato, em sementes de algodão em germinação, não foi inibida pela actinomicina D a 20 µg/ml, sendo ao contrário, estimulada em cerca de 50%. Os autores sugeriram que a insensibilidade à actinomicina D indica a existência de um m-RNA pré-formado nas sementes de algodão.

3.5. Determinação da redutase do nitrato *in vivo* e *in vitro*

A atividade da enzima redutase do nitrato tem sido medida em extratos de plantas, "in vitro" (BEEVERS *et alii*, 1964), e em discos de folhas, "in vivo" (KLEPPER *et alii*, 1971). Alguns estudos têm tentado estabelecer uma relação entre as atividades da redutase do nitrato "in vivo" e "in vitro". Contudo, segundo TINGEY *et alii* (1974), as duas determinações referem-se a estimativas de diferentes parâmetros da redução do nitrato na planta. A atividade determinada "in

vitro" é modificada por fatores que afetam diretamente a estabilidade da redutase do nitrato, a capacidade de extração da enzima, e é influenciada por inibidores liberados ou ativados durante o processo de solubilização. A determinação da redutase do nitrato "in vivo" permite a manutenção da relação espacial entre a enzima e as outras proteínas dentro da célula, mas é afetada por fatores que alteram as reações que produzem NAD(P)H.

STREETER e BOSLER (1972) verificaram, em folhas de plântulas de soja, que as determinações da atividade da redutase do nitrato "in vivo" apresentaram valores superiores às análises "in vitro", em todas as amostragens efetuadas. Este fato sugeriu que as condições para a determinação "in vitro" não refletiram a verdadeira capacidade do tecido em reduzir nitrato. A estimativa da atividade "in vivo" foi cerca de 3 vezes mais sensível que a determinação "in vitro". Por esta razão, e devido ao fato de que a atividade da enzima decresceu com a idade da planta, os autores concluíram que a determinação "in vivo" reflete melhor a atividade real da redutase do nitrato em plantas de soja.

CHANTAROTWONG *et alii* (1976) observaram que a relação entre as determinações da atividade da redutase do nitrato "in vivo" e "in vitro", em plântulas de cevada, é bastante complexa. A redução "in vivo" atingiu o equilíbrio após 3 ou 4 horas em condições indutivas, ao passo que a atividade da redutase do nitrato "in vitro" ainda apresentava aumento após 12 horas.

BRUNETTI e HAGEMAN (1976) testaram a eficiência das determinações da atividade da redutase do nitrato "in vivo" e "in vitro" para estimar a quantidade de nitrogênio reduzido colocado à disposição da planta, comparado com o aumento diário de nitrogênio acumulado em plântulas de trigo. Embora a regressão linear entre a quantidade de nitrogênio acumulado

na planta e a concentração de nitrogênio estimada através da atividade da redutase do nitrato "in vitro" e "in vivo" tenham sido positivas e significativas, esta última forneceu a aproximação mais precisa da quantidade de nitrogênio realmente acumulado nos tecidos.

3.6. Efeito da remoção dos cotilédones no desenvolvimento das plantas

O desenvolvimento inicial das plantas de soja é dependente das reservas armazenadas nos cotilédones. Estes desempenham um importante papel, pois são os sítios de acumulação das duas principais reservas, lipídeos e proteínas, que durante a germinação são hidrolizados e translocados para o ápice embriônico em desenvolvimento (GREEN e SUDIA, 1969).

Várias pesquisas com diferentes espécies de plantas mostraram que a perda total ou parcial das reservas das sementes pode alterar de alguma forma o crescimento ou desenvolvimento normal das plantas.

MCALISTER e KROBER (1951) mostraram que plântulas de soja, que tiveram seus cotilédones removidos na emergência ou 2 dias mais tarde, apresentaram decréscimos na altura e tendências para a redução na produção de grãos. Entretanto, a remoção dos cotilédones 4 dias após a emergência, não teve efeito sobre o desenvolvimento da planta.

MOORE (1964), em estudo efetuado com 5 variedades de ervilha, verificou que a excisão dos cotilédones, 4 dias após o plantio, causou uma inibição no crescimento da parte aérea de 24 a 48%. A remoção dos cotilédones também atrasou a antese em cerca de 2 semanas.

WEBER e CALDWELL (1966) obtiveram resultados que indicaram que a presença de um cotilédone foi essencial para a produção máxima de plantas de soja. A remoção dos dois co-

tilédones por ocasião da emergência reduziu em 8,5% a produção das plantas. Contudo, a retirada dos cotilédones, quando as folhas primárias estavam totalmente expandidas não teve efeito sobre a produção.

MOORE (1967) observou que a remoção dos cotilédones, no período entre o 3º e o 9º dias após o plantio reduziu a taxa de crescimento de plântulas de ervilha. A severidade do efeito foi decrescendo com o aumento da idade das plântulas em que os cotilédones foram removidos.

KILLEEN e LARSON (1968) destacaram os cotilédones de plântulas de ervilha de diferentes idades e verificaram que, quando a remoção teve lugar após o 13º dia de crescimento, aparentemente não houve efeito nocivo no crescimento. Entretanto, a remoção dos cotilédones antes do 13º dia resultou em plantas aparentemente normais, mas com redução no peso de matéria seca.

SRIVASTAVA (1975) verificou que a atividade da redutase do nitrato em folhas de plântulas de feijão de 7 dias, nas quais os cotilédones foram removidos após 6 dias de crescimento, foi cerca de 2,5 vezes maior do que em folhas de plântulas intactas.

CHIN e AITKEN (1976) concluíram que as reservas das sementes, tanto cotilédones (ervilha) como endosperma (trigo), eram importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A completa remoção do material de reserva das sementes, de ambas as espécies dobrou o tempo de iniciação floral, retardando conseqüentemente, o florescimento e maturação dos grãos.

CHIN *et alii* (1977) verificaram que um dos efeitos da remoção dos cotilédones de plântulas de soja, 24 horas após a embebição foi reduzir o desenvolvimento subsequente. Por outro lado, a longevidade das plantas tratadas aumentou em cerca de 30 dias e o início da senescência foi retardado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill), cultivar Santa Rosa, fornecidas pela Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo.

O cultivar Santa-Rosa é tardio, com o ciclo vegetativo ao redor de 131 dias e crescimento determinado. Apresenta flores brancas e a pubescência é marrom claro. As sementes são amarelas com hilo bastante destacado, grão e de cor marrom, e contêm aproximadamente 21.5% de óleo e 39% de proteína (MIRANDA *et alii*, 1977).

Em condições de laboratório, com temperatura e umidade adequada, a semente de soja germina, ocorrendo a emergência dos cotilédones após 2 dias. O primeiro par de folhas, que são as folhas primárias, se desenvolve após 6 dias de germinação, seguido pelo crescimento da primeira folha trifoliolada, que inicia a expansão decorridos 8 dias.

4.1. Condições de germinação e crescimento das plântulas

As sementes foram postas para germinar em vermiculita, em caixas de polietileno de 56 cm de comprimento, 24 cm de largura e 18 cm de altura. Foram semeadas em cada caixa aproximadamente 200 sementes que apresentavam poder germinati-

vo de 90%. Após permanecerem no escuro por um período de 48 horas à 26°C de temperatura, as caixas contendo as sementes em germinação foram transferidas para câmara de crescimento com luz contínua e temperatura constante. A intensidade luminosa no interior da câmara foi de aproximadamente 0.1 cal por cm^2 por minuto, fornecida por lâmpadas fluorescentes e incandescentes na proporção de 2:1 watts, respectivamente, e temperatura ao redor de 28°C.

A semeadura foi bastante superficial, cerca de 1 cm, para que os cotilédones recebessem luz imediatamente após serem transferidos para a câmara de crescimento. Durante o período de crescimento, as sementes em germinação, e em seguida as plântulas em desenvolvimento, foram irrigadas com soluções com diferentes teores de nitrogênio, especialmente preparadas para cada tratamento, utilizado nos vários experimentos, os quais serão oportunamente descritos.

4.2. Atividade da enzima redutase do nitrato

As determinações da atividade da enzima redutase do nitrato "in vivo" foram feitas de acordo com o método descrito por MAGALHÃES (1973), utilizando-se 100 mg de material vegetal fresco, no caso das folhas primárias e primeira folha trifoliolada, e 500 mg para as análises com cotilédones. Ao tecido vegetal, seccionado em pedaços de aproximadamente $0,25 \text{ cm}^2$, foram adicionados 10 ml de meio de reação de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5), preparado com água destilada ou solução de KNO_3 0,05 M, e 1% de n-propanol. As amostras, no meio de reação, foram infiltradas a vácuo por duas vezes (1 minuto) seguidas de brusca introdução de ar e, em seguida, incubadas no escuro, em banho-maria com agitação à temperatura de 33°C, tendo-se o cuidado de manter o tecido completamente imerso na solução. Após 30 e 60 minutos de reação, tempo considerado suficiente para se obter uma taxa constante de difusão do nitri-

to formado, foram retiradas alíquotas de 0,2 ml, as quais foram recebidas em tubo de ensaio contendo 1 ml de 1% de sulfanilamida em HCl 1,5 M, 1 ml de N-1-naftil-etileno diamino di HCl e 1,8 ml de água destilada. A quantidade de nitrito produzido foi determinada colorimetricamente pela leitura da absorbância das soluções a 540 nm. A atividade da enzima redutase do nitrato foi estimada pela diferença das quantidades de nitrito presentes no meio entre 30 e 60 minutos de reação. A calibração do método foi realizada preliminarmente a fim de que a técnica pudesse ser otimizada com referência ao tamanho da alíquota, quantidade de tecido, relação entre volume do meio de incubação e peso do tecido, e intervalo de tempo de reação. A atividade da enzima foi referida em μ moles de NO_2^- formado por grama (matéria seca ou fresca) de tecido, por hora [μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}$ (m.s ou m.f) $\cdot \text{h}^{-1}$].

4.3. Análise de clorofila

As determinações de clorofila dos cotilédones, durante o período inicial de desenvolvimento das plântulas, foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por ARNON (1949). Meio grama de tecido foi macerado em gral de porcelana com 5 ml de tampão fosfato 0.1 M (pH 7.5). Alíquotas de 0,1 ml do extrato foram incubadas com 20 ml de acetona 80%, permanecendo no escuro por 15 minutos. A concentração de clorofila (a + b) foi determinada pela leitura da absorbância das amostras em 652 nm, em fotocolorímetro.

4.4. Atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones

Neste estudo, as sementes de soja, logo após terem sido colocadas para germinar, foram irrigadas com soluções contendo diferentes níveis de nitrato, fornecido sob a forma de KNO_3 . As concentrações de nitrato das soluções usadas foram 0, 3 e 15 mM, correspondendo, respectivamente, a 0,

1/5 e 1 vezes a quantidade de NO_3^- encontrada na solução de HOAGLAND e ARNON (1939).

A atividade da enzima redutase do nitrato foi calculada nos cotilédones durante o desenvolvimento, através de determinações realizadas após 0, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 122, 146 e 192 horas de exposição à luz contínua, utilizando-se meio de reação contendo nitrato. Foram feitas três repetições para cada tratamento.

A fim de evitar erros na expressão dos resultados de atividade enzimática, devido à variação no teor de umidade do tecido no decurso do desenvolvimento dos cotilédones, os valores foram sempre expressos em termos de peso de matéria seca. As determinações da quantidade de clorofila (a+b) dos cotilédones em desenvolvimento foram realizadas decorridas 6, 30, 54, 78, 102, 150 e 174 horas de exposição à luz contínua.

4.5. Efeito de inibidores da síntese de proteínas na indução da atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones

Os inibidores de síntese de proteínas usados neste estudo foram a cicloheximida e a actinomicina D.

Neste experimento, as sementes foram irrigadas com uma solução 15 mM de nitrato, imediatamente após serem postas para germinar.

A cicloheximida foi aplicada às sementes em germinação após 0, 1, 2, 5, 8 e 20 horas de exposição à luz contínua. Cerca de 15 sementes, com a radícula já desenvolvida, foram retiradas da caixa de germinação e mergulhadas em recipientes com solução de cicloheximida 50 $\mu\text{g/ml}$ e outro contendo tampão fosfato a 0,05 M (controle), durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, as sementes foram lavadas rapidamente com água destilada e transferidas para copos de polietileno

contendo vermiculita. Após 22 horas de exposição à luz contínua foi determinada a atividade da redutase do nitrato, usando-se meio de reação com nitrato.

A actinomicina D, a uma concentração de 25 µg/ml, foi aplicada às sementes, ainda no escuro, nos tempos 0, 24 e 48 horas após o início da germinação, de maneira análoga à descrita no parágrafo anterior.

Com a finalidade de evitar que a não absorção da actinomicina D mascarasse prováveis efeitos sobre a atividade da redutase do nitrato nas sementes durante a germinação, foi realizado um teste preliminar em que a solução do inibidor foi infiltrada a vácuo (2 + 2 minutos) no tempo 0.

Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições para cada tratamento.

4.6. Dinâmica da partição da atividade da enzima redutase do nitrato durante a fase inicial de desenvolvimento das plantas

As sementes em germinação foram inicialmente irrigadas com água destilada e, posteriormente, com solução de Hoagland, contendo 15 mM de NO_3^- , no momento em que foram transferidas para a luz contínua. A vários intervalos de tempo, foi determinada a atividade da enzima nos cotilédones, nas folhas primárias e na primeira folha trifoliolada, utilizando-se meio de reação com e sem nitrato. As análises nos cotilédones foram efetuadas 74, 98, 146, 170 e 290 horas após a transferência das plântulas para a luz contínua. As determinações nas folhas foram feitas logo após o início de sua expansão, e se estenderam por 98, 146, 170, 242, 290 e 338 horas, para as folhas primárias, e 146, 170, 242, 290 e 338 horas, para a primeira folha trifoliolada.

Os pesos da matéria seca dos cotilédones, folhas primárias e primeira folha trifoliolada, foram determinados em três amostras de aproximadamente 1 g de tecido.

4.7. Efeito dos níveis de nitrato das soluções nutritivas na atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas primárias

As plântulas foram obtidas colocando-se as sementes para germinar em vermiculita, no escuro, e irrigando-se com água destilada. Após 48 horas, quando os cotilédones já emergiam, as plântulas foram transferidas para câmara de crescimento e passaram a receber soluções nutritivas 0, 7,5, 15, 22,5 e 30 mM de NO_3^- . As concentrações de 0 e 15 mM correspondem, respectivamente, às soluções nutritivas sem nitrogênio e completa, descritas por SARRUGE (1975). As demais foram obtidas subtraindo-se e/ou acrescentando-se progressivamente 2,5 ml/l de KNO_3 M e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ M, à solução completa. O pH de todas as soluções nutritivas se manteve ao redor de 6,0.

As análises da enzima redutase do nitrato foram efetuadas nas folhas primárias, com e sem nitrato no meio de reação, após 144 horas de luz contínua.

4.8. Efeito da remoção dos cotilédones na atividade da enzima redutase do nitrato e no desenvolvimento das plântulas

As sementes de soja foram postas para germinar em vermiculita, irrigadas de maneira análoga ao descrito no item 4.6, e após 48 horas de luz contínua (24 horas após a emergência) foram realizados tratamentos de remoção de 1 e 2 cotilédones das plântulas em desenvolvimento, deixando-se os cotilédones intactos nas plântulas utilizadas como controle.

4.8.1. Atividade da enzima redutase do nitrato

As determinações da atividade da enzima redutase do nitrato foram efetuadas nas folhas primárias e na primeira folha trifoliolada usando-se meio de reação com e sem nitrato.

As determinações nas folhas primárias com 1 e 2 cotilédones foram realizadas após 74, 102, 122, 170, 218, 266 e 362 horas de transferência para a luz contínua. Como no tratamento sem cotilédones, a expansão das folhas primárias foi retardada em comparação com as plântulas nas quais 1 ou 2 cotilédones foram mantidos, a atividade enzimática foi avaliada após a exposição das plântulas a 122, 170, 218, 266 e 362 horas de luz contínua.

A atividade da redutase do nitrato determinada na primeira folha trifoliolada das plântulas com 1 e 2 cotilédones, foi medida à 175, 223, 270, 343, 386 e 432 horas de luz contínua. Nas plântulas sem os 2 cotilédones, a primeira folha trifoliolada não se desenvolveu até o final do experimento. Todas as determinações foram feitas com três repetições para cada tratamento.

Paralelamente a todas as análises de atividade enzimática, foram determinados os pesos da matéria fresca de aproximadamente 15 folhas, visando-se obter o peso de uma folha, para que os resultados da atividade da enzima pudessem ser expressos em μ moles de NO_2^- por folha, por hora (μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

4.8.2. Desenvolvimento das plântulas

A contribuição dos cotilédones no crescimento inicial das plantas foi avaliada através dos seguintes parâmetros:

4.8.2.1. Matéria seca dos cotilédones

Com a finalidade de estudar o esgotamento das reservas das sementes no desenvolvimento de plântulas intactas e plântulas com apenas um cotilédone, foram determinados os pesos da matéria seca dos cotilédones. Essas avaliações foram efetuadas em 6 repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu no conjunto dos cotilédones de quatro plântulas. Na avaliação inicial, ou seja, após 48 horas de luz contínua, os cotilédones estavam presentes em todas as plântulas em estudo. Esse resultado foi dividido por dois para que pudesse ser comparado com os dados das análises subsequentes, correspondentes às plântulas com um cotilédone. De maneira análoga procedeu-se com os resultados obtidos das plântulas que permaneceram até o final do experimento com os dois cotilédones.

As determinações dos pesos da matéria seca dos cotilédones foram feitas após 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 264 e 336 horas de exposição à luz contínua. Este procedimento consistiu de secagem do material vegetal, em estufa a 60°C, até peso constante, o que ocorreu após, aproximadamente, dois dias.

4.8.2.2. Altura e matéria seca do caule

O efeito da remoção dos cotilédones no desenvolvimento do caule das plântulas foi avaliado através de medidas de peso da matéria seca e altura, nos mesmos intervalos de tempo em que foram determinados os pesos da matéria seca dos cotilédones. As determinações desses parâmetros foram efetuadas com 6 repetições para cada tratamento.

4.8.2.3. Área foliar e matéria seca das folhas primárias e primeira folha trifoliolada

As determinações dos pesos da matéria seca das folhas primárias foram iniciadas logo após a sua expansão, ou seja, após 96 horas de exposição à luz, para as plântulas com 1 e 2 cotilédones, e 120 horas para o tratamento sem cotilédones. Para a primeira folha trifoliolada as avaliações da matéria seca foram iniciadas após 216 horas de tratamento com luz contínua, nos tratamentos com 1 e 2 cotilédones. Nas plântulas em que foram removidos os dois cotilédones, a primeira folha trifoliolada não se expandiu no decorrer do experimento.

A superfície foliar das folhas primárias e primeira folha trifoliolada foi avaliada com integrador de área, modelo portátil, nas mesmas épocas em que foram feitas as determinações da matéria seca, ou seja, 168, 192, 216, 240, 264 e 336 horas, para as folhas primárias das plântulas sem cotilédones, 96, 120, 168, 192, 216, 240, e 336 horas para as folhas primárias das plântulas com 1 e 2 cotilédones, e 216, 240, 264, e 336 horas para a primeira folha trifoliolada das plântulas com 1 e 2 cotilédones.

Todas as determinações foram feitas com 6 repetições para cada tratamento e cada repetição consistiu na soma das áreas ou matéria seca das folhas de 4 plantas.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones

Como pode ser observado na fig. 1, o início da atividade da enzima redutase do nitrato nos cotilédones ocorreu após 20 horas de exposição à luz contínua, aumentando rapidamente até atingir o máximo de atividade após decorridas aproximadamente 120 horas de iluminação. Os valores máximos de atividade enzimática foram 25,8, 42,9 e 52,5 μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} (\text{m.s}) \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente, para as concentrações de nitrato nas soluções de 0,3 e 15 mM. Durante a fase de indução da atividade da redutase do nitrato foi observada uma proporcionalidade entre os valores de atividade enzimática e os níveis de nitrato nas soluções de irrigação.

As curvas referentes à acumulação de matéria fresca e teor de clorofila dos cotilédones, durante a fase inicial de desenvolvimento da plântula, estão representadas na fig. 2. Foi verificado que o desenvolvimento inicial da plântula e o processo de enverdecimento dos cotilédones estão associados com a indução da atividade da redutase do nitrato. Tanto o teor de clorofila como a matéria fresca atingiram valores máximos entre 100 e 120 horas de exposição à luz contínua, havendo, portanto, uma coincidência com os padrões de atividade da redutase do nitrato mostrados na fig. 1.

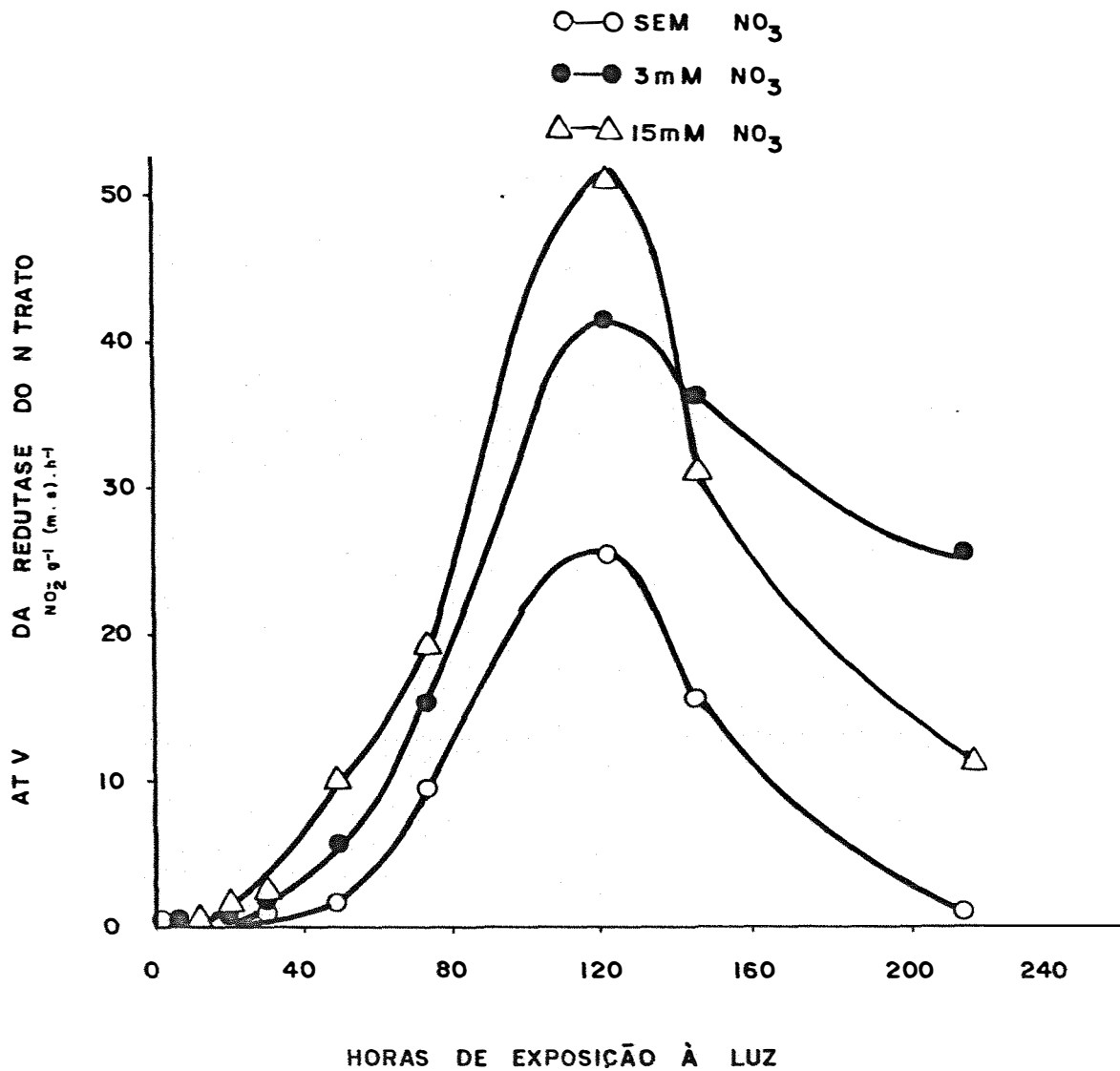


Fig. 1-Atividade da enzima redutase do nitrato, expressa em μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} (\text{m.s}).\text{h}^{-1}$, em cotilédones de plântulas de soja irrigadas com soluções 0, 3 e 15 mM de nitrato. Média de 3 repetições.

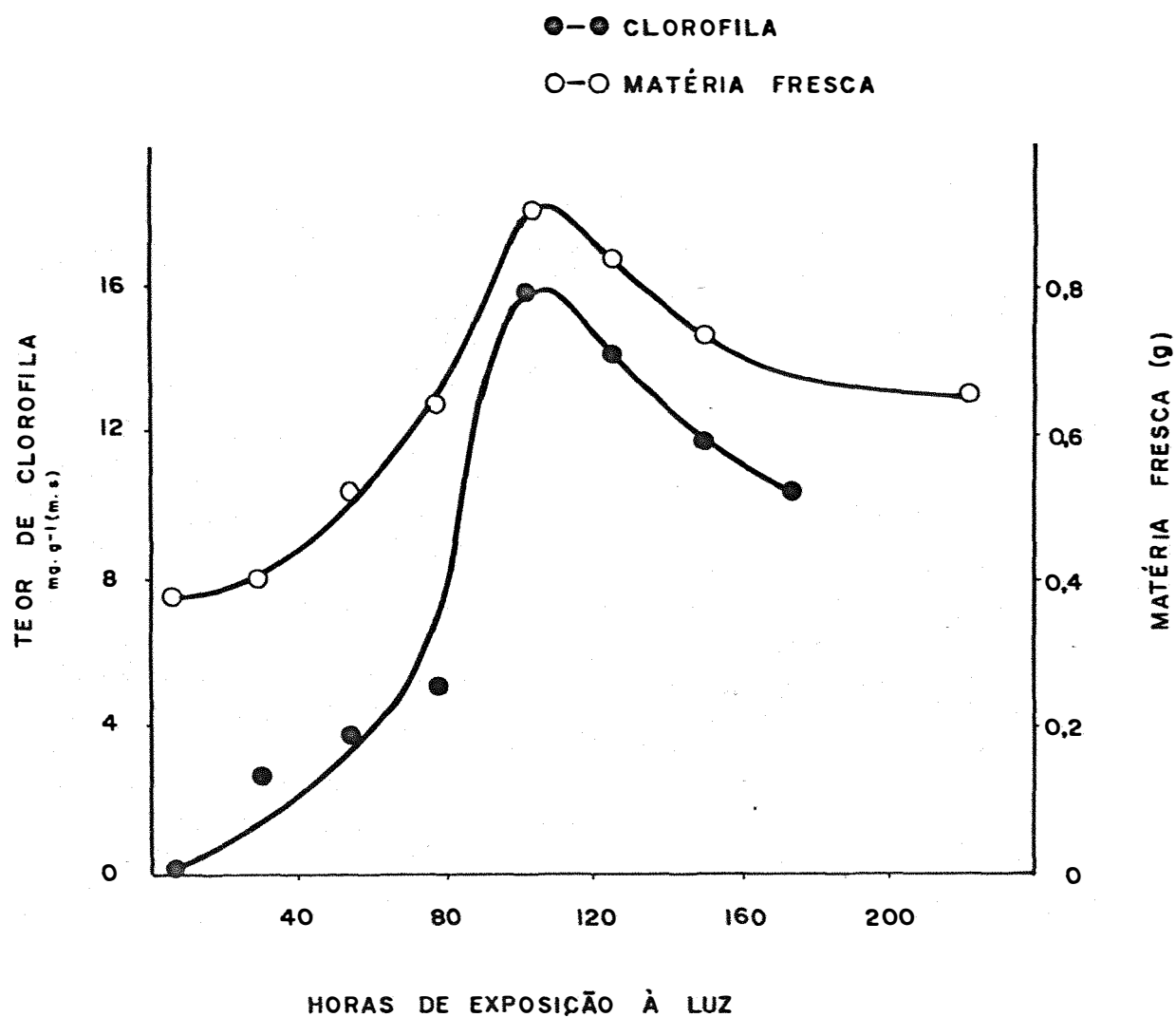


Fig. 2-Teor de clorofila ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de matéria seca) e peso de matéria fresca (g) de um par de cotilédones de plântulas de soja em desenvolvimento. Média de 3 repetições.

5.2. Efeito de inibidores da síntese de proteínas na indução da atividade da redutase do nitrato nos cotilédones

Os tratamentos das plântulas com cicloheximida foram efetuados a partir do início do período de iluminação (tempo zero), porque os resultados obtidos no experimento descrito no item anterior mostraram que o início da atividade da redutase do nitrato nos cotilédones ocorreu após, aproximadamente, 20 horas de exposição à luz contínua. Por outro lado, TRAVIS *et alii* (1970.a) reportaram que o papel da luz na promoção da indução da redutase de nitrato está associado com o desenvolvimento e manutenção do sistema de síntese de proteína.

As determinações da atividade da redutase do nitrato nos cotilédones, durante o tratamento das plântulas com cicloheximida, estão sumarizadas no quadro 1. Os resultados mostram que, quando o inibidor foi aplicado imediatamente antes da exposição à luz, a atividade da redutase do nitrato nos cotilédones foi sensivelmente afetada, apresentando apenas 3% da atividade enzimática determinada no controle. Entretanto, dependendo da fase de desenvolvimento da plântula (tempo de exposição à luz) em que foi aplicada a cicloheximida, o efeito inibitório sobre a atividade da enzima foi decrescendo, como pode ser observado na fig. 3. Quando as plântulas foram tratadas com o inibidor 20 horas após a exposição à luz contínua, o efeito da cicloheximida sobre a redutase do nitrato foi bem menor, e a atividade enzimática correspondeu a 81% da atividade do controle. Esta diferença não foi estatisticamente significativa, sendo que as demais apresentaram significância ao nível de 1%. Os coeficientes de variação desses experimentos oscilaram entre 6 e 17%, sendo que o valor mais alto ocorreu nas determinações efetuadas no tempo zero, aonde os níveis da atividade enzimática dos cotilédones das plântulas que receberam cicloheximida, eram muito baixos para serem determinados.

Quadro 1 - Efeito da cicloheximida, aplicada em diversos tempos, na indução da atividade da redutase do nitrato (μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}(\text{m.f.}) \cdot \text{h}^{-1}$) em cotilédones de soja. Média de 6 repetições.

TEMPO DE APLICAÇÃO	ATIVIDADE DA NR			
	horas de luz	controle	cicloheximida	d.m.s. (1%)
0		0,88	0,03	0,24
1		0,96	0,08	0,11
2		0,86	0,09	0,11
5		0,79	0,15	0,13
8		0,97	0,33	0,22
15		0,91	0,71	0,10
20		0,91	0,74	0,25

d.m.s. - diferença mínima significativa a 1% probabilidade

Quadro 2 - Efeito da actinomicina D, aplicada em diversos tempos, na indução da atividade da redutase do nitrato (μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}(\text{m.f.}) \cdot \text{h}^{-1}$) em cotilédones de soja. Média de 6 repetições.

TEMPO DE APLICAÇÃO	ATIVIDADE DA NR			
	horas de germinação	controle	actinomicina D	d.m.s. (5%)
0		1,90	1,59	0,32
24		2,17	1,84	0,38
48		2,05	2,08	----

d.m.s. - diferença mínima significativa a 5% probabilidade

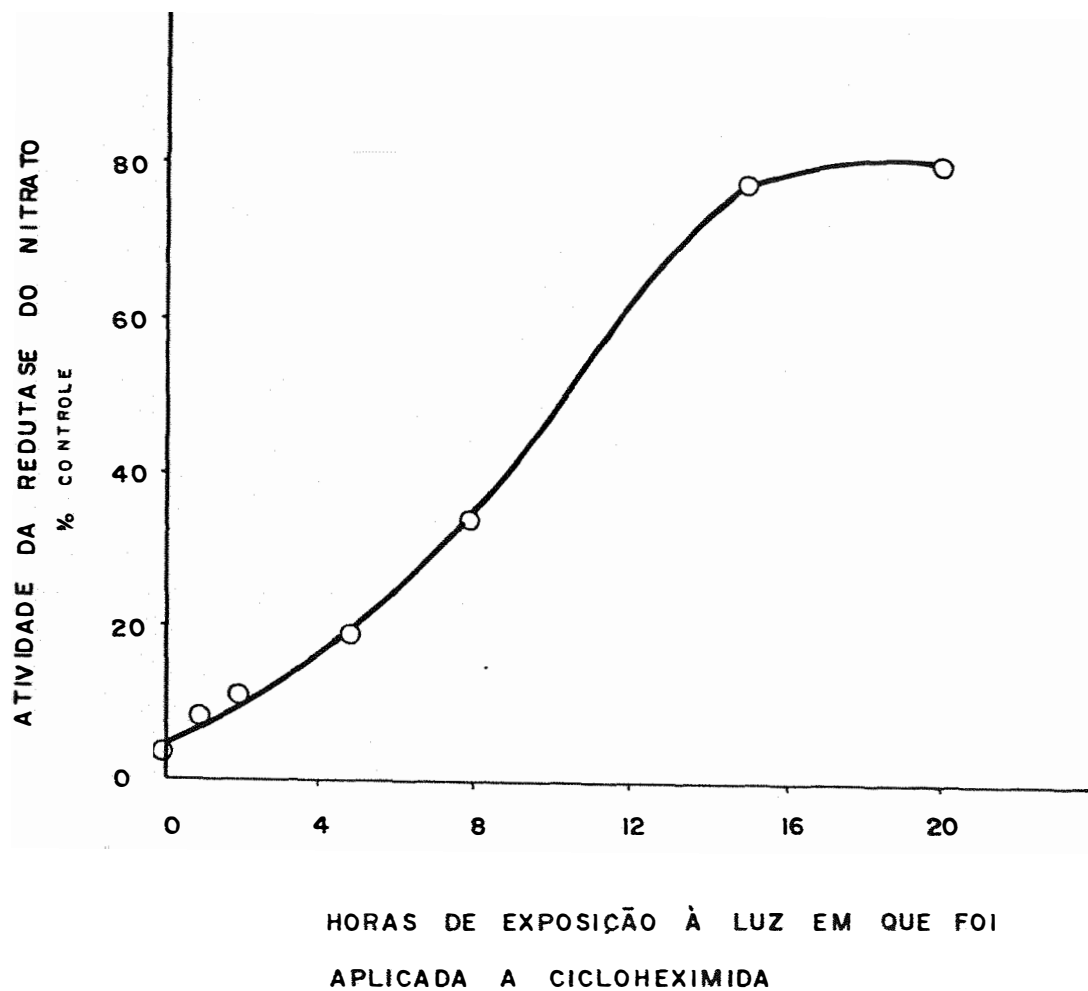


Fig. 3 - Efeito da cicloheximida, aplicada em vários intervalos de tempo, na indução da atividade da enzima redutase do nitrato (expressa em % do controle) em cotilédones de plântulas de soja. Média de 6 repetições.

A actinomicina D, um inibidor da síntese de RNA, foi fornecido às sementes em processo de germinação, ainda no escuro e desde o início da embebição.

Os efeitos do tratamento das sementes com actinomicina D sobre a atividade da redutase do nitrato, durante a fase inicial de germinação, estão expressos no quadro 2. A partir dos dados obtidos, pode-se observar que a actinomicina D praticamente não inibiu a atividade da redutase do nitrato nos cotilédones. Os valores obtidos não foram estatisticamente significativos e os coeficientes de variação oscilaram entre 12 e 15%.

Os estudos efetuados com e sem infiltração a vácuo da solução de actinomicina D, para verificar se as sementes absorviam adequadamente o inibidor, não mostraram diferenças entre os tratamentos.

5.3. Partição da atividade da enzima redutase do nitrato durante a fase inicial de desenvolvimento da planta

Os resultados das determinações da atividade da redutase do nitrato, durante o processo de desenvolvimento dos cotilédones, folhas primárias e primeira folha trifoliolada, usando-se meio de reação sem e com nitrato, estão representados nas figs. 4 e 5, respectivamente.

Na fig. 5, pode ser observado que a atividade máxima nos cotilédones ocorreu entre 100 e 120 horas de iluminação e foi de $34,1 \mu \text{ moles NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} (\text{m.s}) \cdot \text{h}^{-1}$. Após esse tempo, a atividade enzimática nos cotilédones decresceu suavemente. A fase de aumento da atividade da enzima nas folhas primárias coincidiu com o período de máxima atividade nos cotilédones. A atividade da redutase do nitrato nas folhas primárias aumentou com a idade, atingindo o valor máximo de $251,6 \mu \text{ moles NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} (\text{m.s}) \cdot \text{h}^{-1}$, ao redor de 170 horas de exposição à luz, decrescendo logo a seguir. O mesmo fenômeno foi

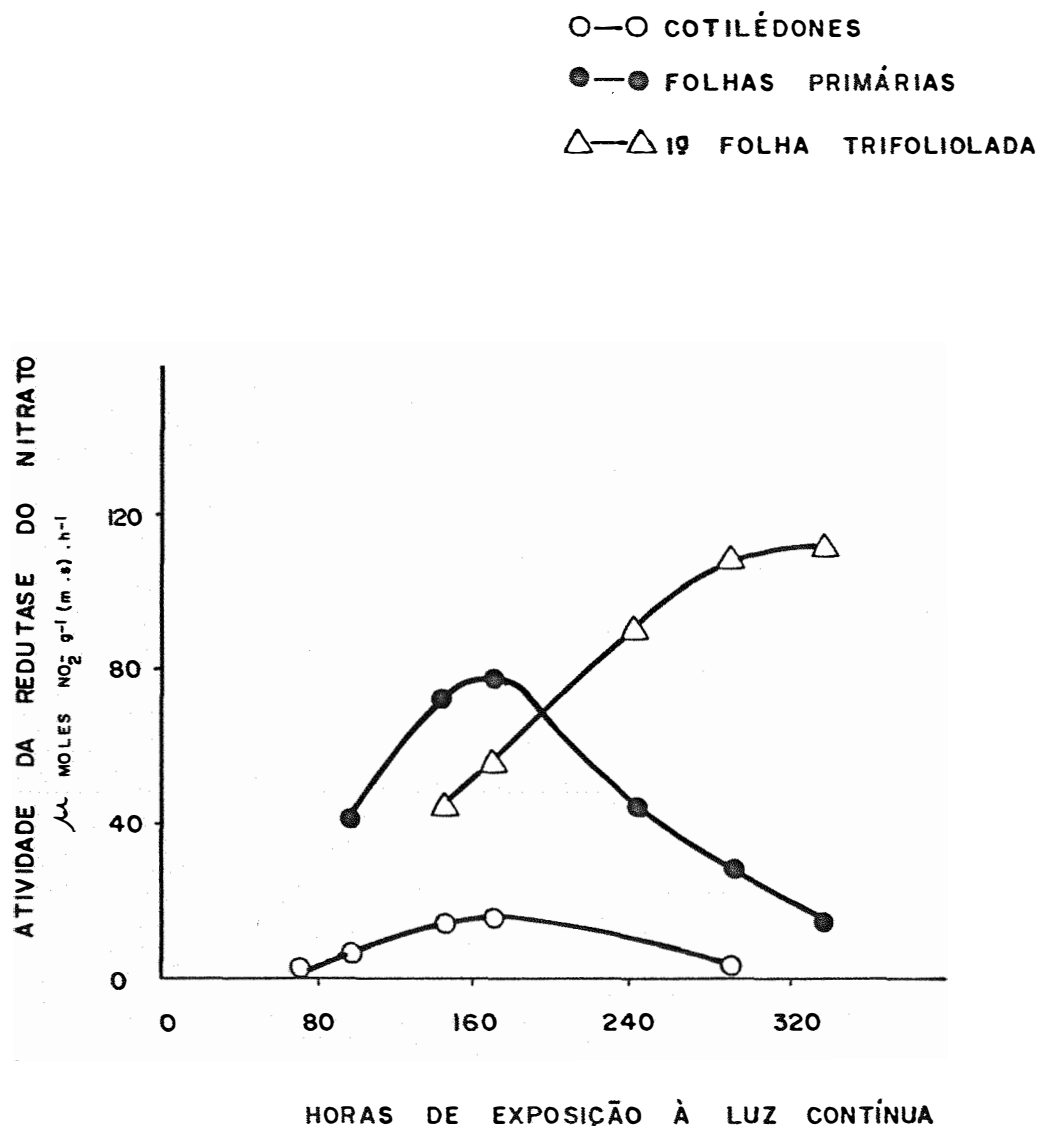


Fig. 4 - Atividade da enzima redutase do nitrato, expressa em μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}$ (m.s.) . h^{-1} , durante o processo de ontogênese de cotilédones, folhas primárias e primeira folha trifoliolada de plantas de soja. Meio de reação sem nitrato. Média de 3 repetições.

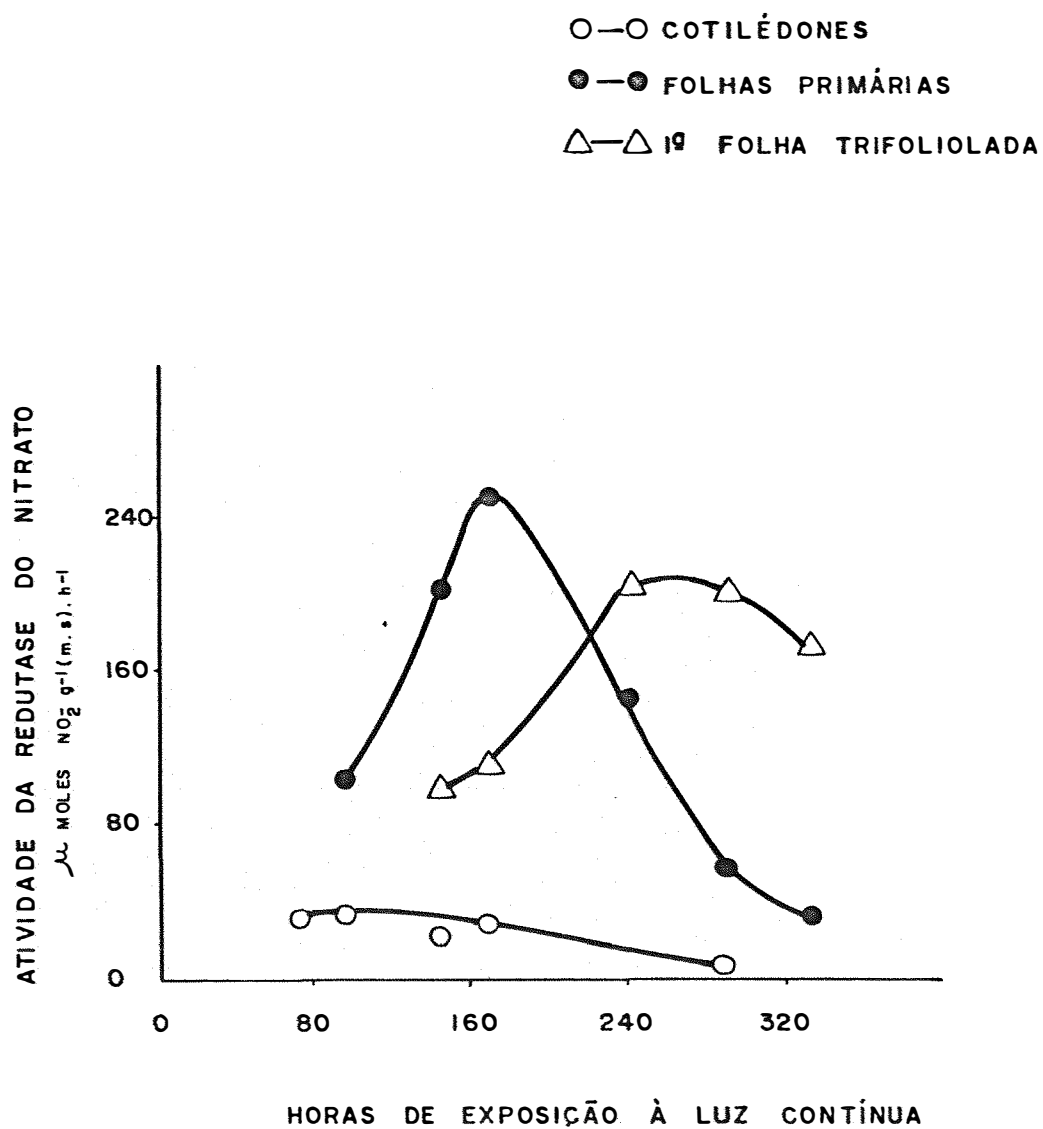


Fig. 5 - Atividade da enzima redutase do nitrato, expressa em μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}$ (m.s.) $\cdot \text{h}^{-1}$, durante o processo de ontogênese dos cotilédones, folhas primárias e primeira folha trifoliolada de plantas de soja. Meio de reação com nitrato. Média de 3 repetições.

observado na fase seguinte de crescimento, na qual o decréscimo da atividade nas folhas primárias foi acompanhado do aumento da atividade da enzima na primeira folha trifoliolada. A atividade máxima da redutase do nitrato na primeira folha trifoliolada foi de $207,2 \mu \text{ moles NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} (\text{m.s}) \cdot \text{h}^{-1}$, e ocorreu entre 240 e 260 horas de exposição à luz.

As determinações da atividade enzimática, quando efetuadas com nitrato no meio de reação (fig. 5), foram sempre superiores às determinações sem nitrato (fig. 4), tanto nos cotilédones, como nas folhas primárias e primeira folha trifoliolada. Tomando-se por base a atividade máxima da redutase do nitrato nos tecidos vegetais em estudo, verificou-se que as determinações enzimáticas efetuadas com nitrato no meio de reação foram cerca de 2,3, 3,2 e 2,2 vezes maiores que as análises sem nitrato, respectivamente, para os cotilédones, folhas primárias e primeira folha trifoliolada.

Nas determinações sem nitrato no meio de reação, a atividade máxima da enzima nas folhas primárias foi menor do que a atividade máxima na primeira folha trifoliolada (fig. 4). Entretanto, quando o nitrato foi fornecido ao meio de reação da enzima, a atividade máxima nas folhas primárias foi superior à da primeira folha trifoliolada (fig. 5).

5.4. Efeito dos níveis de nitrato das soluções nutritivas na atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas primárias

Na fig. 6, pode ser observado que, à medida que aumenta a concentração de nitrato das soluções nutritivas, diminui a diferença entre as atividades da redutase do nitrato, analisadas com e sem nitrato no meio de reação. Contudo, os valores das determinações com nitrato no meio de reação ainda foram cerca de 2,2, 2,1, 1,7 e 1,6 vezes maiores do que as análises sem nitrato, respectivamente para as soluções nutritivas

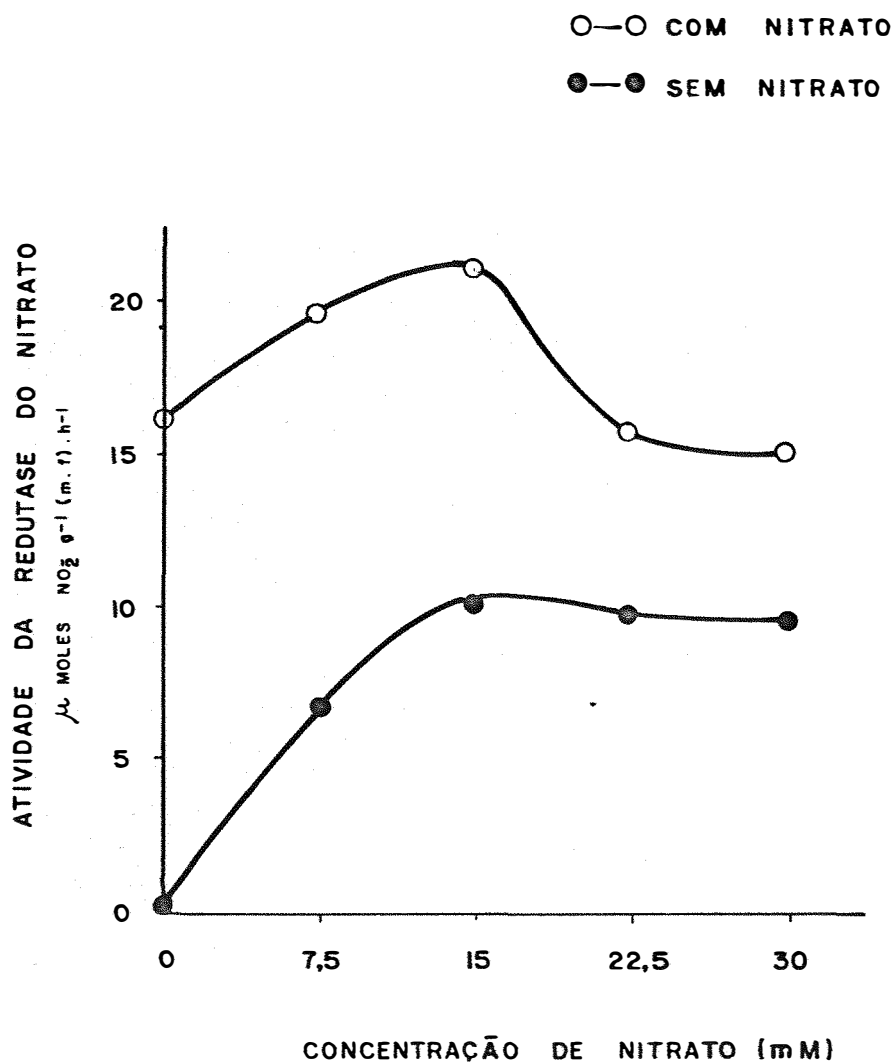


Fig. 6 - Atividade da enzima redutase do nitrato, expressa em μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}(\text{m.f.}) \cdot \text{h}^{-1}$, nas folhas primárias de plantas de soja, após 144 horas de luz contínua. As plântulas foram irrigadas com soluções nutritivas com várias concentrações de nitrato. Meio de reação da enzima com e sem nitrato. Média de 3 repetições.

7,5, 15, 22,5 e 30 mM de nitrato. Como pode ser observado na fig. 6, a atividade enzimática aumentou com os acréscimos de nitrato das soluções nutritivas até a concentração de 15 mM, decrescendo a seguir. A atividade da enzima foi praticamente nula nas determinações sem nitrato no meio de reação, nas folhas primárias das plântulas crescidas em ausência de nitrato na solução de irrigação.

5.5. Efeito da remoção dos cotilédones na atividade da enzima redutase do nitrato e no desenvolvimento das plântulas

5.5.1. Atividade da enzima redutase do nitrato

Como pode ser observado nas figs. 7 e 8, a remoção dos cotilédones afetou a atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas primárias, quando expressa em μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Todos os valores obtidos no tratamento com nitrato no meio de reação (fig. 8) foram superiores aos sem nitrato no meio de reação (fig. 7). Durante o desenvolvimento das plântulas, as atividades máximas da redutase do nitrato nas folhas primárias das plântulas com 1 e 2 cotilédones removidos foram, respectivamente 65 e 9%, da atividade enzimática das plântulas intactas (fig. 8). Resultados semelhantes foram obtidos quando as análises da enzima foram efetuadas sem nitrato no meio de reação (fig. 7). As curvas da atividade da enzima, apresentadas na fig. 7 mostram que a remoção dos cotilédones causou um deslocamento do pico de atividade máxima. Deste modo, as atividades máximas da redutase do nitrato foram atingidas após 146, 194 e 218 horas de exposição à luz contínua, respectivamente para as folhas das plântulas intactas, e plântulas com 1 e 2 cotilédones removidos.

As figs. 9 e 10 mostram o efeito da remoção de 1 cotilédone na atividade da enzima (expressa em μ moles $\text{NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) na primeira folha trifoliolada, determinada em meio

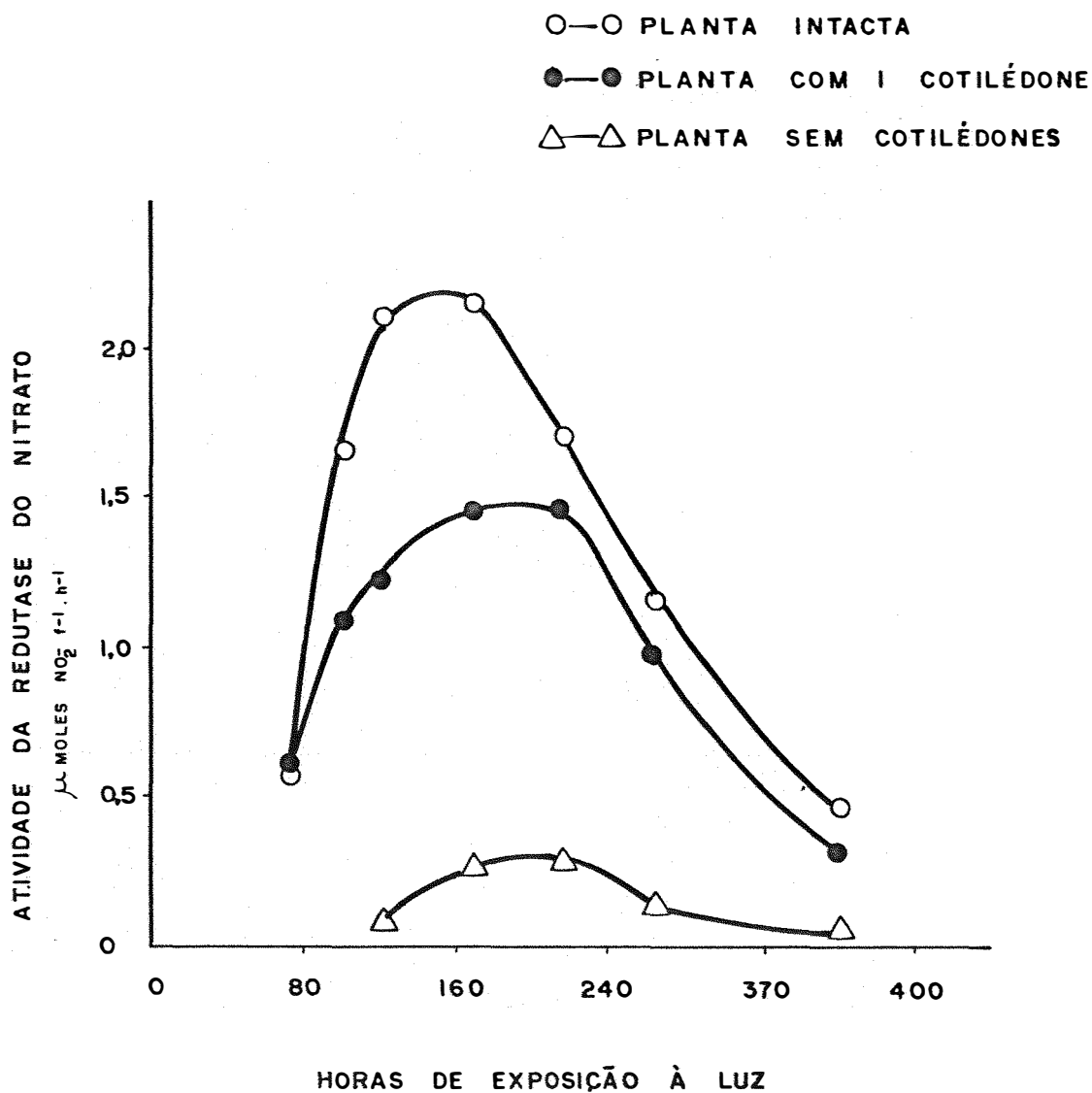


Fig. 7 - Efeito da remoção de 1 e 2 cotilédones, 24 horas após a emergência, na atividade da enzima redutase do nitrato (μ moles de $\text{NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) durante o desenvolvimento das folhas primárias de plântulas de soja. Meio de reação sem nitrato. Média de 3 repetições.

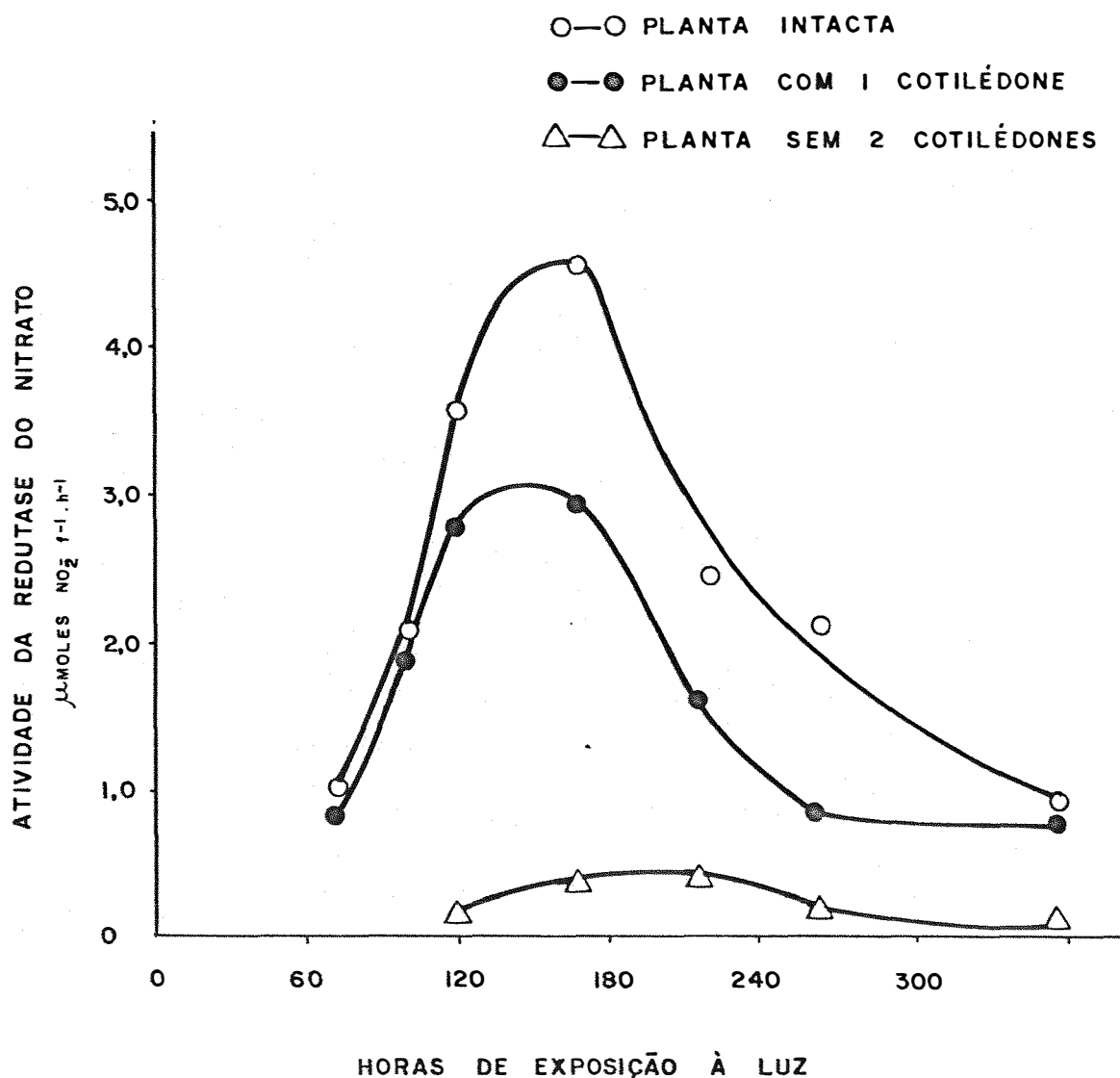


Fig. 8 - Efeito da remoção de 1 e 2 cotilédones, 24 horas após a emergência, na atividade da enzima redutase do nitrato ($\mu\text{ moles de NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) durante o desenvolvimento das folhas primárias de plântulas de soja. Meio de reação com nitrato. Média de 3 repetições.

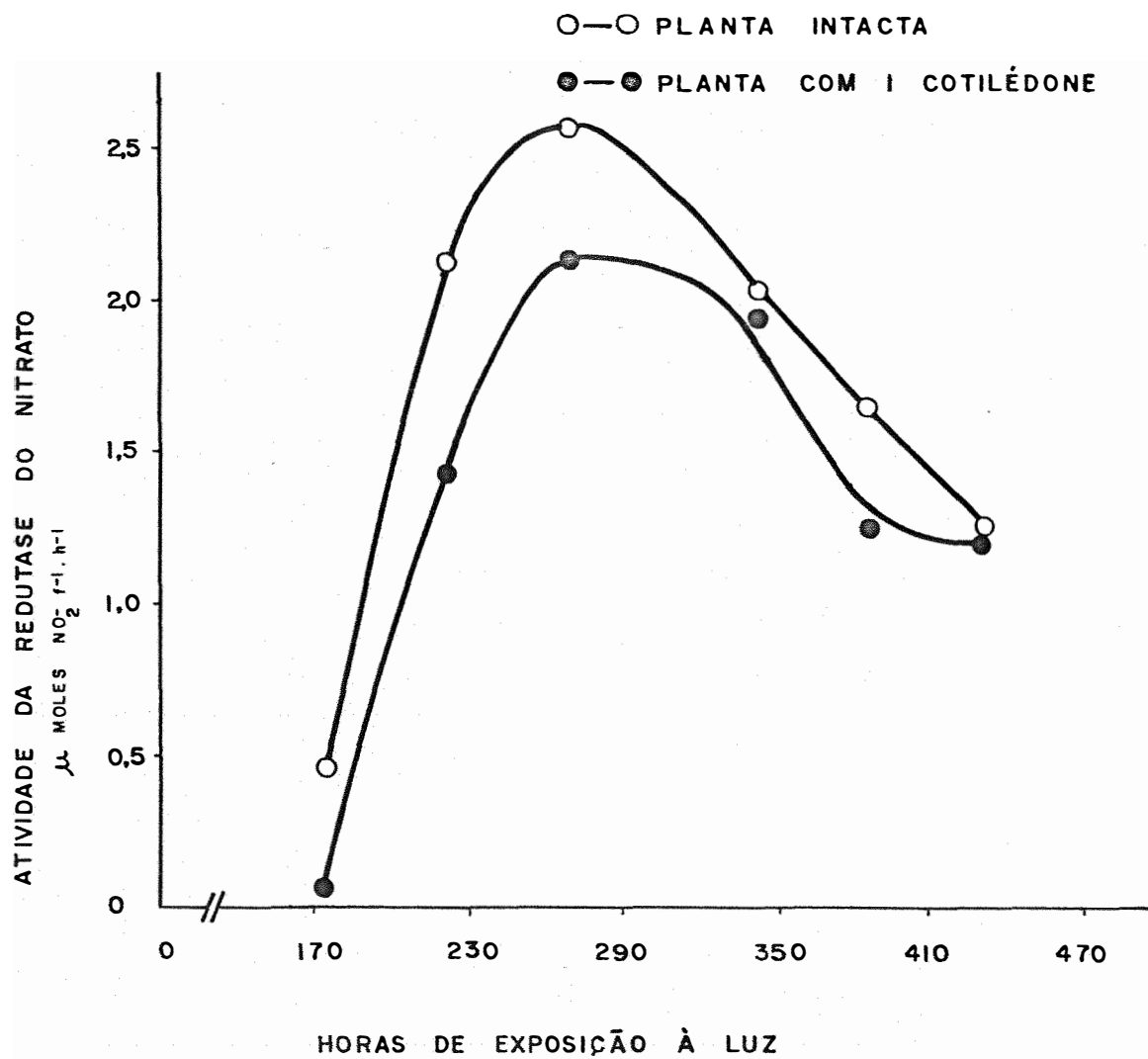


Fig. 9 - Efeito da remoção de 1 cotilédone, 24 horas após a emergência, na atividade da enzima redutase do nitrato ($\mu\text{ moles de NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) durante o desenvolvimento da primeira folha trifoliolada de plântulas de soja. Meio de reação sem nitrato. Média de 3 repetições.

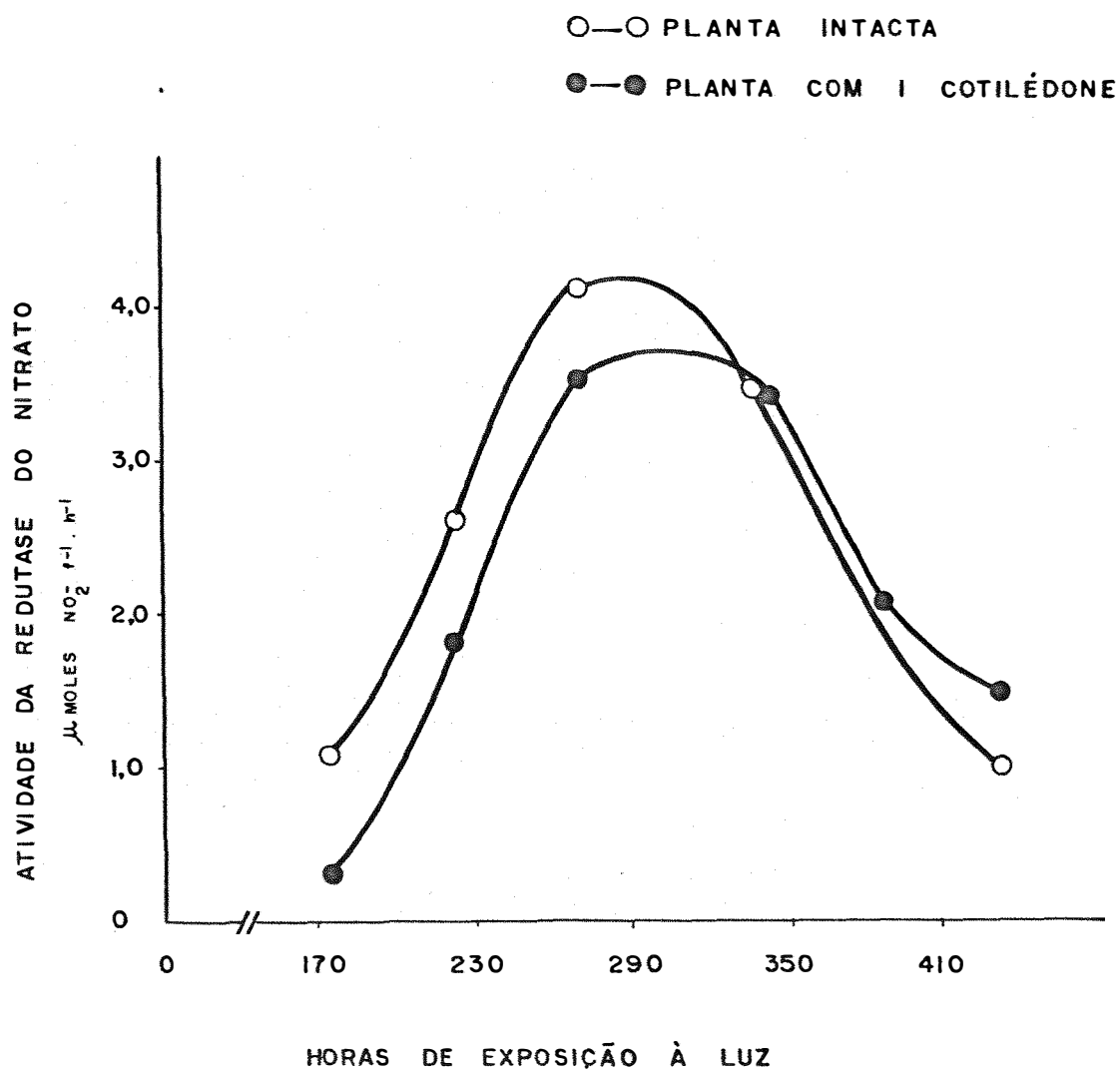


Fig. 10 - Efeito da remoção de 1 cotilédone, 24 horas após a emergência, na atividade da enzima redutase do nitrato ($\mu\text{moles de NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) durante o desenvolvimento da primeira folha trifoliolada de plântulas de soja. Meio de reação com nitrato. Média de 3 repetições.

de reação sem e com nitrato, respectivamente. A influência da excisão de 1 cotilédone na atividade enzimática da primeira folha trifoliolada foi menos acentuada do que nas folhas primárias, embora no tratamento sem cotilédones, a primeira folha trifoliolada não tenha se expandido durante o decorrer do experimento. De maneira análoga ao observado para as folhas primárias, as determinações da atividade da redutase do nitrato efetuadas com nitrato no meio de reação (fig. 10) foram superiores às determinações sem nitrato (fig. 9).

5.5.2. Desenvolvimento das plântulas

5.5.2.1. Matéria seca dos cotilédones

Os resultados das determinações dos pesos da matéria seca de 2 pares de cotilédones, durante o crescimento das plântulas, estão ilustrados na fig. 11. Houve um declínio no peso dos cotilédones de 76%, para as plântulas com 1 cotilédone, e de 74% no caso das plântulas intactas, no intervalo de tempo compreendido entre 72 e 336 horas de luz contínua. Ambas as curvas foram extremamente semelhantes, não havendo, portanto, diferença entre os tratamentos no esgotamento do material de reserva dos cotilédones.

5.5.2.2. Altura e matéria seca do caule

As curvas das figs. 12 e 13 mostram a influência da excisão dos cotilédones na altura e matéria seca do caule das plântulas em crescimento. Como pode ser observado na fig. 12, a remoção dos 2 cotilédones diminuiu sensivelmente a altura do caule e esse decréscimo foi se acentuando com o transcorrer do desenvolvimento das plântulas. Deste modo, a diferença inicial, após 72 horas de luz, entre esses dois tratamentos foi de 2,61 cm, ao passo que no final do experimento, após 336 horas de luz, a diferença atingiu 28,5 cm. A retirada de 1 cotilédone das plântulas em crescimento afetou a al-

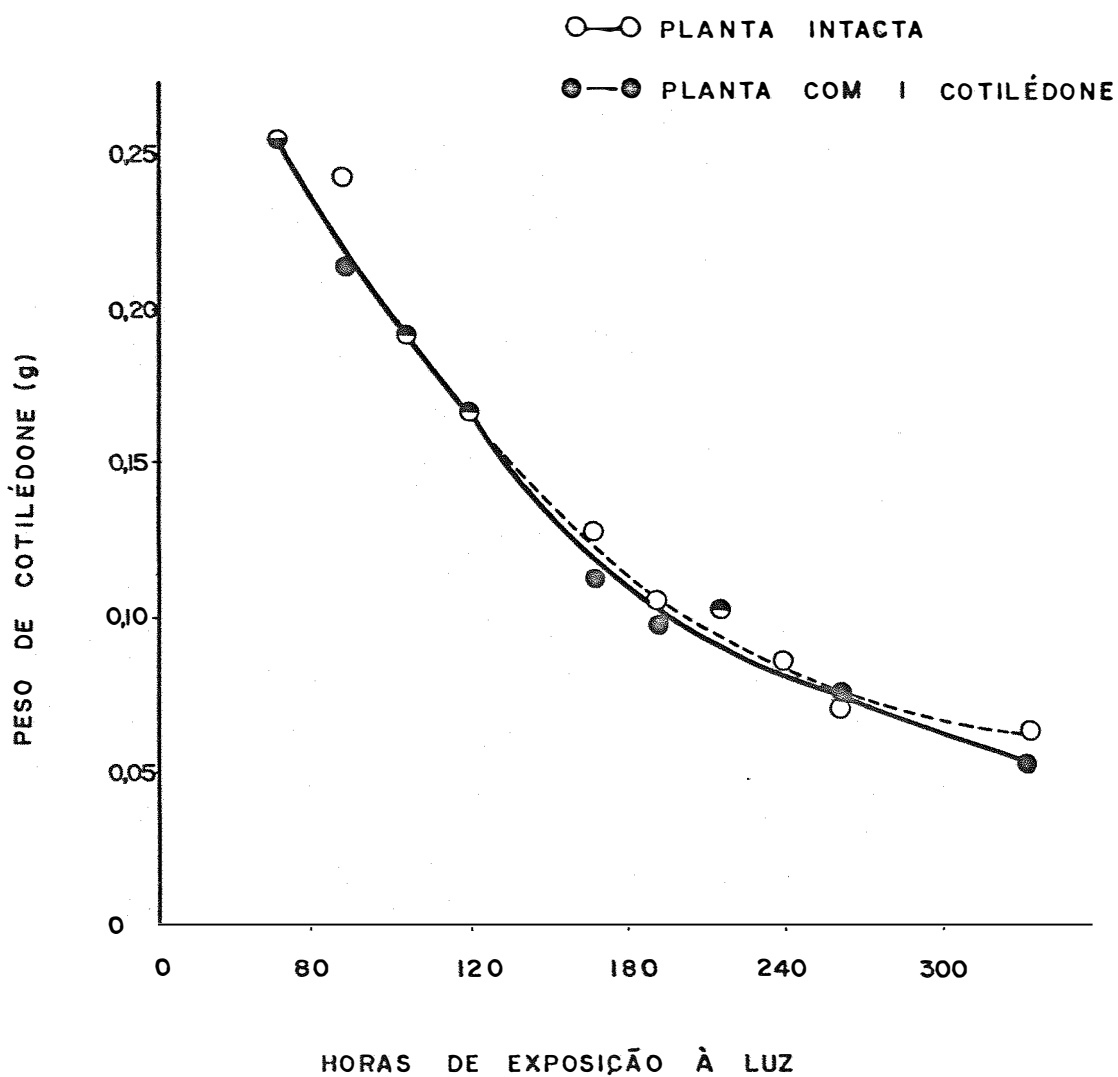


Fig. 11 - Peso da matéria seca (g) de 2 pares de cotilédones, durante o desenvolvimento de plântulas de soja intactas e plântulas com 1 cotilédone. Média de 6 repetições.

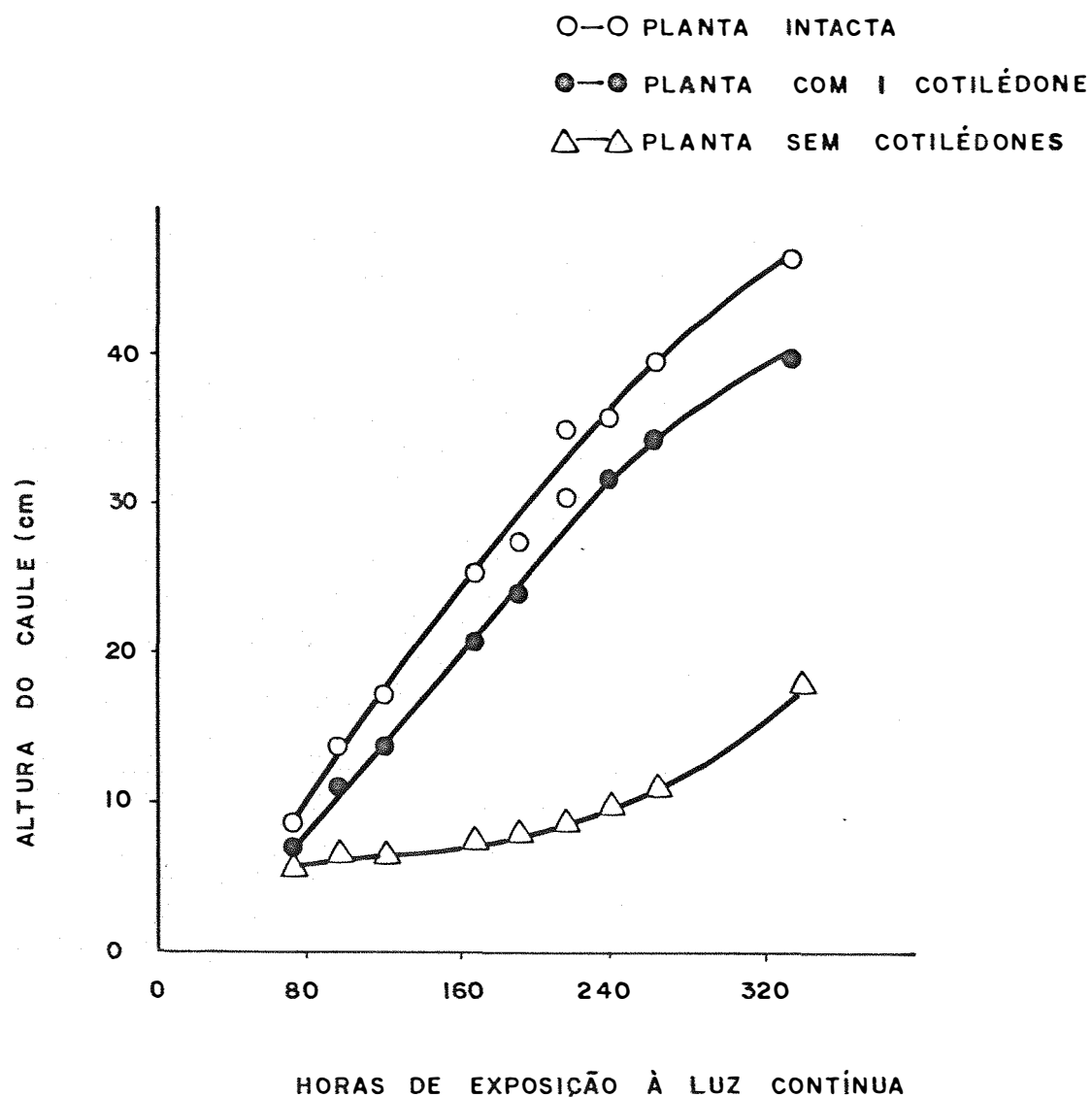


Fig. 12 - Efeito da remoção de 1 e 2 cotilédones, 24 horas após a emergência, na altura do caule (cm) durante o desenvolvimento inicial de plantas de soja. Média de 6 repetições.

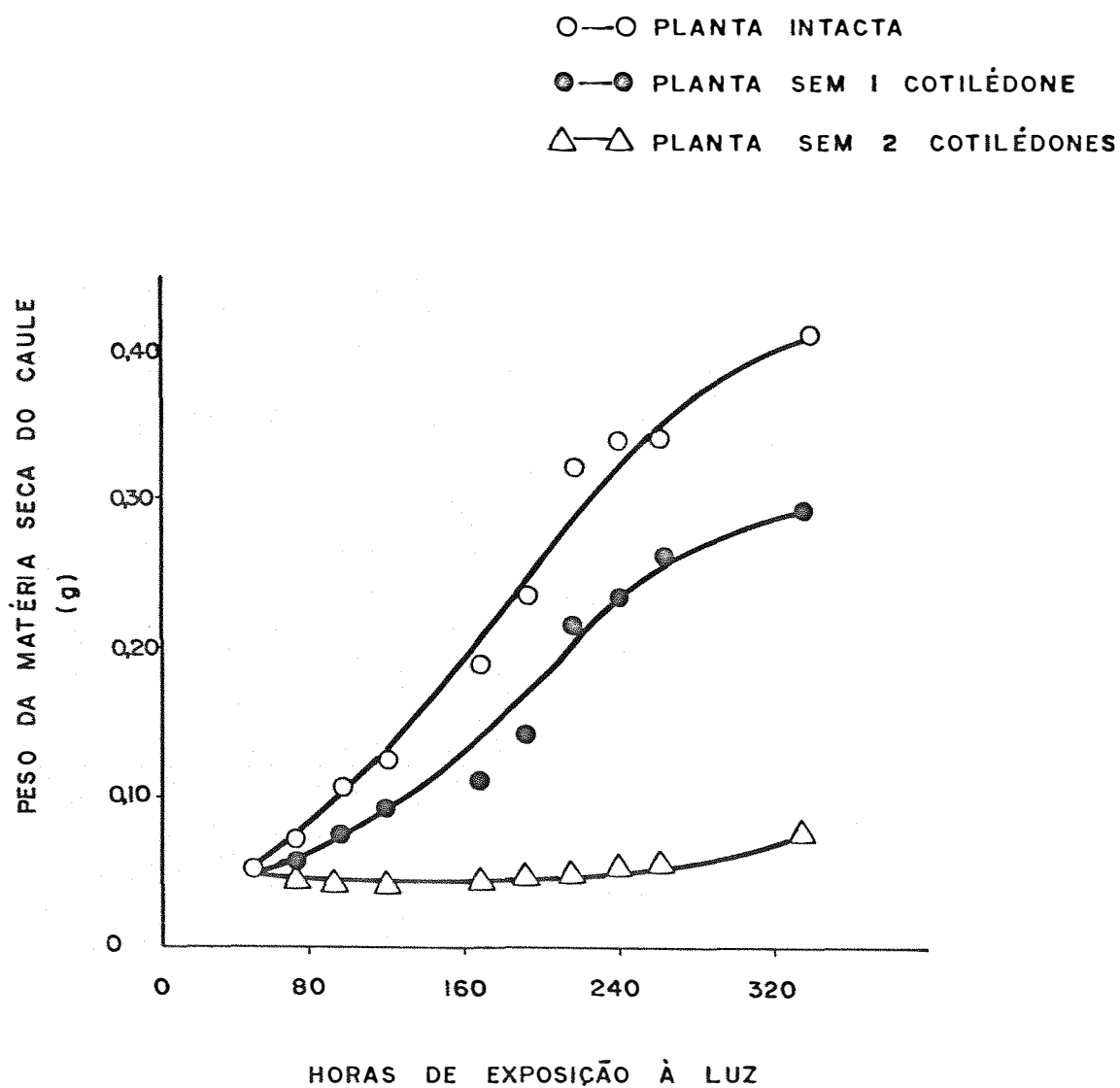


Fig. 13 - Efeito da remoção de 1 e 2 cotilédones, 24 horas após a emergência, no acúmulo de matéria seca (g) do caule, durante o desenvolvimento inicial de plantas de soja. Média de 6 repetições.

tura do caule em menor proporção, cerca de 1,77 e 6,42 cm após 72 e 336 horas de exposição à luz, respectivamente.

A fig. 13 mostra o efeito da retirada dos cotilédones na acumulação de matéria seca do caule. Este parâmetro foi reduzido em cerca de 35%, após 72 horas de luz, e 81% após 336 horas de luz, nas plântulas sem cotilédones, quando comparadas com o controle. Os caules das plântulas com apenas 1 cotilédone ainda apresentaram reduções na matéria seca de 24 e 29%, respectivamente após 72 e 336 horas de exposição à luz contínua. As diferenças entre os pesos da matéria seca do caule das plântulas intactas e plântulas com cotilédones removidos apresentaram tendência a aumentar com o transcorrer do tempo do experimento.

5.5.2.3. Área foliar e matéria seca das folhas primárias e primeira folha trifoliolada

Os dados referentes à determinação da área das folhas primárias e primeira folha trifoliolada, durante o crescimento de plântulas intactas e plântulas com 1 e 2 cotilédones removidos, estão expressos na fig. 14.

Após 240 horas de luz, época em que as folhas primárias das plantas intactas já estavam totalmente expandidas, a área foliar das plântulas com 1 e sem cotilédones apresentaram reduções de 21 e 75%, respectivamente, quando comparadas com o controle. A remoção dos 2 cotilédones também afetou o início da expansão das folhas primárias, causando um atraso de 72 horas em relação às plântulas intactas. O desenvolvimento da primeira folha trifoliolada foi pouco alterado pela remoção de 1 cotilédone. Os resultados indicaram que, com o decorrer do crescimento da primeira folha trifoliolada, o efeito negativo da retirada de 1 cotilédone vai desaparecendo. Ao contrário, a primeira folha trifoliolada, das plântulas nas quais os 2 cotilédones foram removidos, não se

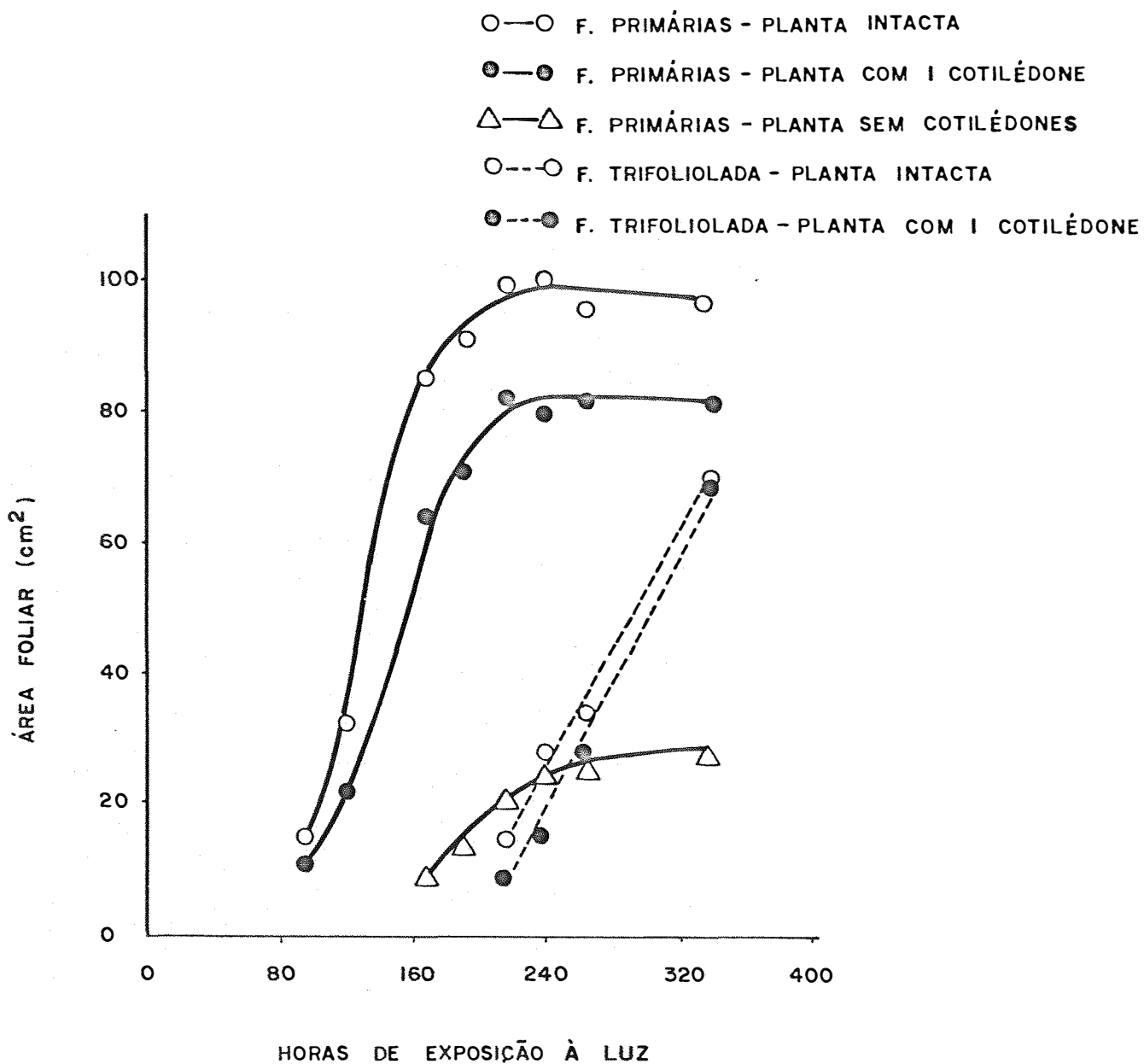


Fig. 14 - Efeito da remoção de 1 e 2 cotilédones na área (cm²) das folhas primárias e primeira folha trifoliolada de plantas de soja em desenvolvimento. Média de 6 repetições e cada repetição é a soma das áreas das folhas de 4 plantas.

- F. PRIMÁRIA - PLANTA INTACTA
- F. PRIMÁRIA - PLANTA COM 1 COTILÉDONE
- △—△ F. PRIMÁRIA - PLANTA SEM COTILÉDONES
- F. TRIFOLIOLADA - PLANTA INTACTA
- F. TRIFOLIOLADA - PLANTA COM 1 COTILÉDONE

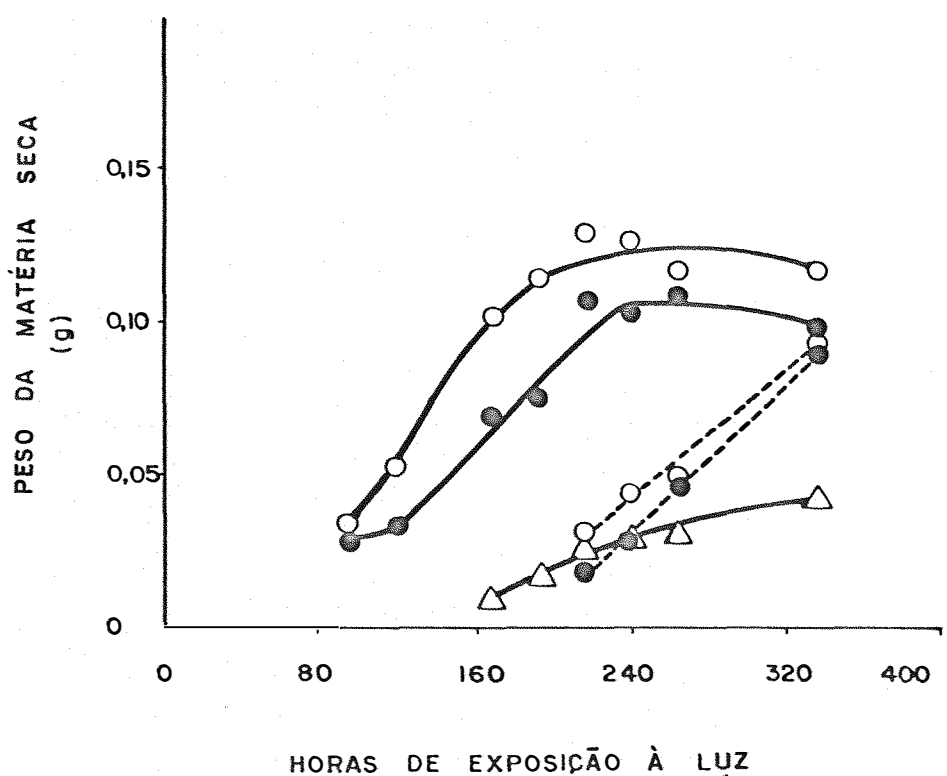


Fig. 15 - Efeito da remoção de 1 e 2 cotilédones no acúmulo de matéria seca (g) das folhas primárias e primeira folha trifoliolada de plantas de soja em desenvolvimento. Média de 6 repetições e cada repetição é a soma dos pesos das folhas de 4 plantas.

expandiu até o término do experimento.

A fig. 15 mostra o efeito da remoção dos cotilédones no acúmulo de matéria seca das folhas primárias e primeira folha trifoliolada. De modo análogo ao observado para a área foliar, a retirada de 1 e 2 cotilédones reduziu, respectivamente, em cerca de 20 e 78% a matéria seca das folhas primárias, após 240 horas de luz. A remoção de 1 cotilédone também teve pouco efeito no acúmulo de matéria seca da primeira folha trifoliolada.

6. DISCUSSÃO

6.1. Atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones

A influência dos níveis de nitrato das soluções nutritivas na atividade enzimática sugere claramente que a indução da redutase do nitrato, em cotilédones de plântulas de soja em germinação, é dependente do fornecimento de nitrato, como foi observado em outras espécies (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

Há na literatura vários trabalhos que indicam que a indução da atividade da redutase do nitrato, em resposta ao seu substrato nitrato, envolve a síntese de proteína "de novo", mais do que a ativação de proteína pré-existente ou pró-enzima (HEWITT e AFRIDI, 1959; AFRIDI e HEWITT, 1965; BEEVERS *et alii*, 1965; INGLE *et alii*, 1966, 1968.a; SMITH e THOMPSON, 1971.a; ZIELKE e FILNER, 1971). Ao contrário, VEGA *et alii* (1971), trabalhando com *Chlorella*, observaram que o nitrato não foi necessário para a síntese "de novo" da redutase do nitrato. Com a adição de nitrato no meio de reação da redutase do nitrato, mesmo os cotilédones das plântulas que não receberam nitrato mostraram atividade enzimática. Este fato evidencia que a presença de nitrato, ou promoveu a síntese da redutase do nitrato no tempo decorrido da colocação do tecido no meio de reação com nitrato e da infiltração a vácuo, ou proporcionou a ativação de enzima presente nos cotilédones.

Provavelmente, o tempo disponível para que ocorresse a síntese "de novo" da enzima foi muito curto, pois a redutase do nitrato é uma proteína de estrutura bastante complexa e de elevado peso molecular. Por outro lado, quando os valores das determinações da quantidade de nitrito formado, após 30 e 60 minutos de reação, foram colocados em gráfico, não foi observada a existência de uma fase "de espera", sugerindo que pelo menos parte do complexo da enzima já estava presente no tecido em estudo. A segunda hipótese, que seria mais aceita nesse caso, poderia ser colocada em dúvida pelos estudos efetuados com inibidor da síntese de proteínas, que mostraram que a cicloheximida inibiu a atividade da redutase do nitrato nos cotilédones de plântulas de soja em germinação. INGLE (1968) concluiu que a indução da redutase do nitrato, em cotilédones de plântulas de rabanete, envolve somente uma pequena fração da proteína, em função da quantidade total de proteína presente ou de proteína sintetizada durante o período de indução. O mesmo autor sugeriu que é possível que o requerimento de síntese de proteína para a indução, como determinada pelo uso de inibidores, não está diretamente ligado a proteína redutase do nitrato, mas pode envolver a síntese de uma outra proteína necessária para desencadear o aparecimento da atividade da redutase do nitrato.

Recentemente, HEWITT (1977) sugeriu que na luz são sintetizadas as quatro subunidades protéicas que formam a redutase do nitrato. A presença de nitrato seria necessária para a incorporação de moléculas de FAD em duas dessas subunidades e conseqüentemente a formação do complexo enzimático ativo e estável. Os resultados neste trabalho concordam inteiramente com as observações de HEWITT (1977). Deste modo, os cotilédones das plântulas de soja, cultivadas sob luz contínua em ausência de nitrato, provavelmente já continham parcialmente as subunidades essenciais para a formação da redutase do nitrato. A adição de nitrato ao meio de reação teria desencadear

deado o processo de ligação das várias unidades estruturais para a formação do complexo enzimático ativo.

O início da atividade da redutase do nitrato nos cotilédones ocorreu após aproximadamente 20 horas de iluminação, indicando que a luz foi um importante fator na promoção da atividade enzimática.

A semelhança existente entre as curvas de indução da atividade da redutase do nitrato e o teor de clorofila dos cotilédones sugere que ambos os eventos estão relacionados. JORDAN e HUFFAKER (1972) também observaram que o acúmulo de clorofila estava estreitamente associado com o aumento na atividade da redutase do nitrato, em folhas de plântulas de cevada em processo de enverdecimento. Em cotilédones de soja, RADIN (1974) detectou baixos níveis de atividade da redutase do nitrato até que ocorresse a emergência e enverdecimento.

KLEPPER *et alii* (1971) propuseram que, em tecidos verdes, a energia necessária para a redução do nitrato poderia derivar indiretamente da fotossíntese através da oxidação dos carboidratos produzidos fotossinteticamente. O fornecimento exógeno de glicose retardou a perda de atividade da redutase do nitrato que ocorreu quando folhas de plantas de cevada foram colocadas no escuro, sugerindo que um dos principais efeitos da luz poderia ser o fornecimento de fotossintetizados para suportar a respiração, que então conduziria o processo de indução (ASLAM *et alii*, 1973). Entretanto, neste estudo a situação é um pouco mais complexa. Embora os cotilédones de soja realizem fotossíntese (ABRAHAMSEN e MAYER, 1967) eles também contêm material de reserva que é utilizado durante o processo de germinação. ABRAHAMSEN e MAYER (1967) verificaram que a atividade fotossintética de cotilédones de soja, até 10 dias de germinação, compensam em menos de 10% as perdas sofridas pela respiração. Portanto, é pouco provável que a relação entre a fotossíntese e a redução do nitrato, em cotilédones de plântulas de soja, seja unicamente o fornecimento de fotossin-

tetizados. Em folhas de *Perilla frutescens* a adição de glicose não teve efeito na indução ou perda de atividade da redutase do nitrato e a síntese da enzima pareceu depender de fotossíntese ativa (KANNANGARA e WOOLHOUSE, 1967).

Os resultados apresentados mostram que a cicloheximida inibiu a indução da atividade da redutase do nitrato em cotilédones, quando aplicada em diversos intervalos de tempo compreendidos entre zero e 15 horas de exposição à luz contínua. A cicloheximida, aplicada após 20 horas de iluminação, não inibiu de maneira significativa a indução enzimática. A intensidade da inibição foi decrescendo com o aumento do tempo de exposição à luz que foi aplicado o inibidor (quadro 1). Como o início da atividade enzimática ocorre entre 15 e 20 horas de exposição à luz contínua, poderia ser sugerido que após esse tempo já haveria quantidade suficiente de redutase do nitrato para o início da atividade e a cicloheximida não provocaria inibição na enzima. SLUITERS-SCHOLTEN (1973) verificou que a aplicação da cicloheximida após 24 horas de iluminação ainda inibiu a indução da atividade da redutase do nitrato em folhas de plântulas estioladas de feijão. Entretanto, a primeira determinação da atividade da enzima foi realizada após 24 horas de aplicação do inibidor. INGLE *et alii* (1966) mostraram que a atividade da redutase do nitrato e a síntese de proteínas, em cotilédones destacados de plântulas de rabanete crescidas em meio contendo nitrato, foram respectivamente 52 e 28% dos valores iniciais, após 6 horas de incubação em cicloheximida.

Vários autores mostraram que a cicloheximida pode inibir a indução da atividade da enzima por restringir a absorção de nitrato (ELLIS e MACDONALD, 1970; JACKSON *et alii*, 1973). Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho não confirmaram inteiramente aquelas conclusões. Embora não tenham sido efetuadas determinações do teor de nitrato dos tecidos

dos, seria de se esperar que os cotilédones tivessem quantidade suficiente de nitrato, pois as sementes em germinação foram irrigadas com solução 15 mM de nitrato, a partir do período de embebição. Em adição, todas as análises foram efetuadas após infiltração do tecido com nitrato. Na fig. 1 pode ser observado que, mesmo os cotilédones das plântulas que cresceram sem nitrato no meio, mas foram infiltrados com nitrato exógeno, apresentaram atividade máxima equivalente a 50% da atividade das plântulas que foram constantemente irrigadas com solução de nitrato 15 mM. Portanto, o efeito inibitório da cicloheximida, no desenvolvimento da atividade enzimática em cotilédones parece não ter sido devido a bloqueios na absorção de nitrato, embora tal fato não possa ser inteiramente descartado.

A inibição causada pela cicloheximida na atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones de soja parece indicar que o processo requer, pelo menos em parte, a síntese de proteína "de novo", como tem sido documentado em cotilédones de plântulas de rabanete e algodão (BEEVERS *et alii*, 1965; INGLE *et alii*, 1966; RADIN, 1974).

O início da atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones de soja não foi bloqueado pelo tratamento das sementes com actinomicina D. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos em sementes de algodão (RADIN, 1974 e RADIN e TRELEASE, 1976). Em sementes de algodão, a redutase do nitrato é representativa de uma classe de enzimas nas quais o início da atividade durante a germinação não é afetado pela actinomicina D (IHLE e DURE, 1972; RADIN e TRELEASE, 1976). Sementes imaturas de algodão podem ser induzidas a germinar precocemente e produzir quantidades normais de redutase do nitrato. Esses dados são consistentes com o conceito de que o m-RNA que dirige a síntese dessa enzima é produzido algum tempo durante o desenvolvimento e maturação das sementes, sendo que o processo de tradução não ocorre até a germinação.

Os dados aqui apresentados mostram que o início

da atividade da enzima redutase do nitrato, que ocorre nos cotilédones de plântulas de soja durante a germinação e desenvolvimento inicial, foi inibido pela cicloheximida, mas não pela actinomicina D. Esses resultados, mostrando que a atividade enzimática depende da síntese de proteína, mas não da síntese de RNA, sugerem que a produção da enzima pode envolver a tradução de m-RNA para a redutase do nitrato, pré-existente na semente, de maneira análoga ao relatado para sementes de algodão (RADIN e TRELEASE, 1976).

6.2. Dinâmica da partição da atividade da redutase do nitrato durante a fase inicial de desenvolvimento das plantas

Os resultados apresentados nas figs. 4 e 5 mostram que existe uma associação entre o decréscimo da atividade da enzima redutase do nitrato nos cotilédones e o início da atividade nas folhas primárias. O mesmo padrão foi observado entre as folhas primárias e a primeira folha trifoliolada, indicando que há uma redistribuição de funções entre os diferentes tecidos presentes na fase de plântula, que pode ser importante para a continuação do processo de crescimento da planta toda.

A atividade enzimática é baixa nas folhas em início de expansão, atinge valores máximos em folhas quase que totalmente expandidas e declina posteriormente com a idade. HARPER e HAGEMAN (1972) também observaram que a atividade da redutase do nitrato, por grama de matéria fresca por hora, foi mais alta na folha mais apical, na fase de desenvolvimento imediatamente anterior à máxima expansão, e declinou nas folhas localizadas na parte mais basal da parte aérea de plantas de soja. NICHOLAS *et alii* (1976.a), trabalhando com plantas de soja com 5 folhas trifolioladas, constataram que a atividade da redutase do nitrato "in vitro" foi maior nas folhas mais jo-

vens do que nas folhas mais velhas. O decréscimo na atividade enzimática que se manifesta com a idade, observado em diferentes espécies de plantas, tem sido correlacionado com a capacidade do tecido em sintetizar proteínas (WALLACE e PATE, 1965; KANNANGARA e WOOLHOUSE, 1967; BEEVERS e HAGEMAN, 1969; TRAVIS e KEY, 1971). De fato, em plantas anuais, o teor de proteína das folhas atinge o valor máximo quando a folha se torna expandida, declinando logo após. O início do decréscimo no teor de proteína da folha ocorre anteriormente a qualquer indicação visível de queda no teor de clorofila ou outros sintomas de início de senescência (BEEVERS, 1976.a).

A capacidade dos cotilédones em reduzir nitrato, embora a níveis baixos, foi mantida até o tempo em que a primeira folha trifoliolada estava totalmente expandida. Os cotilédones de plântulas de soja, durante a fase de utilização das reservas das sementes, se transformam em tecidos fotossintetizadores, extendendo o período metabolicamente ativo, antes que ocorra o início da senescência (BEEVERS, 1976.b).

Todas as determinações da atividade enzimática, quando efetuadas com infiltração de nitrato exógeno nos tecidos em estudo, foram superiores as análises sem nitrato no meio de reação. Resultados semelhantes foram obtidos por NICHOLAS *et alii* (1976.a,b) em plantas de soja. O aumento na atividade da redutase do nitrato, constantemente observado com a adição de nitrato ao meio de análise "in vivo" sugere que, embora as plântulas tenham se desenvolvido em ambiente contendo nitrato, a disponibilidade deste íon no sítio de redução da enzima foi um fator limitante.

A atividade máxima da redutase do nitrato nas folhas primárias foi menor do que a atividade na primeira folha trifoliolada, quando as determinações foram feitas sem a infiltração de nitrato exógeno. Entretanto, ocorreu o contrário quando as análises foram efetuadas com nitrato no meio de

determinação da enzima. Este fato sugere que o nitrato foi um fator limitante na taxa de assimilação do nitrogênio nas folhas primárias de plântulas de soja. Nas determinações sem nitrato, a única fonte desse íon seria a absorção através das raízes. Como a atividade máxima nas folhas primárias coincide com o rápido aumento de atividade na primeira folha trifoliolada, poderia haver translocação de nitrato e outros compostos para a folha mais jovem, já que as folhas primárias estavam quase que totalmente expandidas. HARPER e HAGEMAN (1972) determinaram a atividade média da redutase do nitrato, "in vivo" com adição de nitrato, da copa inteira de plantas de soja durante o ciclo de desenvolvimento. Os autores verificaram que a atividade mais alta, expressa por grama de matéria fresca por hora, foi obtida na amostragem em que somente as folhas primárias estavam desenvolvidas. Com a expansão da trifoliolada, a atividade enzimática média declinou.

6.3. Efeito dos níveis de nitrato das soluções nutritivas na atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas primárias

A redutase do nitrato é uma enzima induzível pelo substrato sendo que o nível de atividade é, em parte, função da concentração de nitrato (BEEVERS e HAGEMAN, 1969). Os resultados discutidos no item anterior mostraram que a atividade enzimática dos tecidos em estudo foi limitada pela disponibilidade de nitrato. Poder-se-ia esperar que aumentando-se o fornecimento de nitrato às raízes das plântulas, decrescesse a diferença existente entre as determinações enzimáticas efetuadas com e sem infiltração de nitrato exógeno. Tal fato não ocorreu de modo acentuado, sugerindo claramente que a atividade da redutase do nitrato ainda foi limitada pela disponibilidade de substrato.

Em geral, as células das plantas superiores con-

têm dois compartimentos de nitrato: a) um pequeno compartimento no citoplasma, que é rapidamente metabolizável e que pode estar envolvido na indução da redutase do nitrato; b) um grande compartimento de reserva, possivelmente localizado no vacúolo, inacessível à redutase do nitrato (HEIMER e FILNER, 1971; FERRARI *et alii*, 1973; ASHLEY *et alii*, 1975). De fato, SHANER e BOYER (1976), verificaram que a redutase do nitrato praticamente não foi afetada pelo teor de nitrato das folhas, que refletiu principalmente o compartimento vacuolar, não disponível no sítio de ação da enzima. Portanto, a capacidade das raízes em fornecer nitrato para as folhas desempenha um papel muito mais importante na indução da enzima do que o teor de nitrato das folhas (SHANER e BOYER, 1976). HARPER e HAGEMAN (1972) e HARPER *et alii* (1972) verificaram que as plantas de soja respondem parcialmente ao nitrato sugerindo que a absorção daquele íon pode ser o fator limitante do metabolismo do nitrogênio na soja, mais importante do que a própria quantidade de enzima. A capacidade de plantas de soja em absorver nitrato declina com a idade (HARPER, 1971). Entretanto, a pouca diferença na atividade da redutase do nitrato nas folhas primárias de plântulas crescidas em vários níveis de nitrato indicam que já nas fases iniciais de desenvolvimento a absorção de nitrato parece limitar a assimilação do nitrogênio em soja.

A atividade da redutase do nitrato aumentou com a concentração de nitrato até 15 mM e decresceu posteriormente quando as determinações enzimáticas foram efetuadas com a infiltração de nitrato exógeno. Possivelmente a alta concentração de nitrato tenha se constituído em importante fator na redução da atividade da redutase do nitrato. Contudo, as altas concentrações de nitrato não prejudicaram o desenvolvimento normal das plantas, quando comparadas com as baixas concentrações, nas quais as plântulas mostraram sintomas de clorose. Resultados semelhantes foram obtidos em plântulas de rabanete e milho (HAGEMAN e FLESHER, 1960; BEEVERS *et alii*, 1965), pois

o teor de nitrato requerido para a ótima indução da redutase do nitrato varia entre as espécies (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

6.4. Efeito da remoção dos cotilédones na atividade da enzima redutase do nitrato e no desenvolvimento das plântulas

Os cotilédones de soja contêm o material de reserva das sementes, que durante a germinação são hidrolizados e translocados para o ápice em desenvolvimento (GREEN e SUDIA, 1969). Desde que o decréscimo no peso da matéria seca dos cotilédones coincide com o aumento no peso da matéria seca do ápice (MCALISTER e KROBER, 1951), poder-se-ia esperar que a remoção de um cotilédone ocasionasse o esgotamento mais rápido das reservas remanescentes, durante o desenvolvimento da plântula. Tal fato não ocorreu e as curvas de perda de peso de matéria seca dos cotilédones foram extremamente semelhantes para as plântulas intactas e plântulas com apenas um cotilédone. Os cotilédones de soja não servem unicamente como fonte de material de reserva para o desenvolvimento das plântulas, mas também são capazes de realizar fotossíntese, logo após a sua emergência (ABRAHANSEN e MAYER, 1967). BURRIS *et alii* (1973) verificaram que a taxa fotossintética de folhas de plântulas de soja aumentou com o decréscimo do tamanho das sementes de 3,65 para 9,25 mg de CO₂ por decímetro quadrado, por hora. Os mesmos autores concluíram que a menor fotossíntese nas plântulas originadas de sementes maiores poderia ser devido a uma demanda reduzida de fotossintetizados, que seria causada pela maior quantidade de reserva presente nos cotilédones. Deste modo, as plântulas que tiveram um de seus cotilédones removidos, poderiam compensar em parte essa deficiência, através de maiores taxas fotossintéticas. Assim, não haveria alteração na perda de peso de matéria seca dos cotilédones durante o desenvolvimento das plântulas intactas e plântulas com apenas um cotilédone.

O efeito quantitativamente diferente da remoção total ou parcial das reservas das sementes no crescimento inicial das plantas de soja foi semelhante ao reportado por CHIN e AITKEN (1976), em plântulas de trigo e aveia. A retirada de apenas um cotilédone afetou em menor proporção o desenvolvimento das plântulas de soja, as quais, por ocasião da expansão da primeira folha trifoliolada praticamente se equipararam às plântulas controle. WEBER e CALDWELL (1966) também verificaram que a remoção de um cotilédone, por ocasião da emergência, não afetou o desenvolvimento e produção de plantas de soja. Entretanto, a remoção total das reservas cotiledonares ocasionou drástica inibição no desenvolvimento das plântulas, que foi se acentuando com o tempo. Há, na literatura, vários trabalhos que mostram que a retirada dos cotilédones, logo após a emergência, ocasionou reduções no tamanho e produção de plantas de soja (MCALISTER e KROBER, 1951; WEBER e CALDWELL, 1966; CHIN *et alii*, 1977).

Outro efeito causado pela remoção de ambos os cotilédones foi atrasar o desenvolvimento das folhas primárias e primeira folha trifoliolada, o mesmo não ocorrendo com as plântulas que permaneceram com um cotilédone. Resultados similares foram obtidos por CHIN e AITKEN (1976), que verificaram que a remoção da metade das reservas das sementes retardou fracamente a taxa de desenvolvimento de plantas de ervilha e trigo. Em contraste, a remoção total, tanto dos cotilédones como do endosperma, retardou a taxa de crescimento das plantas de ervilha e trigo durante os primeiros 8 e 20 dias, respectivamente. CHIN *et alii* (1977) também constataram que a retirada dos cotilédones durante a embebição, retardou o desenvolvimento e aumentou a longevidade de plantas de soja em aproximadamente 30 dias.

Um dos aspectos a ser considerado é a quantidade de material de reserva das sementes necessária para se ob-

ter boa germinação e desenvolvimento da planta. Embora os dados existentes na literatura sejam bastante contraditórios, parece haver pouca influência do tamanho das sementes de soja no posterior desenvolvimento e produção das plantas (EDWARDS e HARTWIG, 1971; JOHNSON e LUEDERS, 1974). A perda parcial das reservas dos cotilédones, logo após a emergência, afeta em pequena escala o desenvolvimento, entretanto, perdas acima de 50% têm um efeito drástico no crescimento e desenvolvimento inicial das plantas de soja.

O efeito prejudicial da remoção de um e dois cotilédones no crescimento e desenvolvimento das plantas de soja se refletiu na atividade da enzima redutase do nitrato. Deste modo, os decréscimos na atividade da enzima, expressa em μ moles de $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1}$ por folha, observados nas folhas das plântulas com um e dois cotilédones foram devido ao menor peso de matéria seca das folhas. Mas, de qualquer forma, haveria limitações na contribuição das folhas primárias e primeira folha trifoliolada em fornecer compostos nitrogenados para o desenvolvimento das plântulas, desde que a redutase do nitrato é considerada a enzima limitante no processo de incorporação do nitrato em compostos orgânicos (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

A remoção da fonte de reserva dos cotilédones produz, em plantas de mesma idade cronológica, uma diferença em sua idade fisiológica (KILLEEN e LARSON, 1968). Os resultados obtidos neste trabalho, bem como os existentes na literatura (AFRIDI e HEWITT, 1964; WALLACE e PATE, 1965; HARPER e HAGEMAN, 1972), mostraram que a atividade da enzima redutase do nitrato atinge valores máximos quando a folha está quase que totalmente expandida, declinando a seguir. A remoção dos cotilédones retardou o processo de expansão das folhas, atrasando, conseqüentemente, o pico de atividade máxima da redutase do nitrato.

7. CONCLUSÕES

O início da atividade da enzima redutase do nitrato em cotilédones de plântulas de soja, que ocorre após aproximadamente 20 horas de exposição à luz contínua, é dependente da luz e do teor de nitrato das soluções nutritivas fornecidas às plantas. O processo de assimilação do nitrato nos cotilédones é desencadeado pela síntese "de novo" da enzima redutase do nitrato, em presença de luz.

Ocorre uma redistribuição de funções entre os diferentes tecidos presentes na fase de plântula, de tal forma que o declínio na atividade da redutase do nitrato nos cotilédones coincide com o aumento da atividade enzimática nas folhas primárias. O mesmo fenômeno é observado na fase seguinte de desenvolvimento, na qual o aumento da atividade enzimática na primeira folha trifoliolada é acompanhado por decréscimos na atividade das folhas primárias. A atividade da enzima é baixa nas folhas em início de desenvolvimento, atinge valores máximos em folhas quase que totalmente expandidas, e declina posteriormente com a idade.

O processo de assimilação do nitrato, durante o desenvolvimento inicial das plantas de soja, parece ser limitado pela disponibilidade de nitrato no sítio de redução da enzima redutase do nitrato.

A remoção total das reservas cotiledonares, 24 horas após a emergência das plântulas, afeta sensivelmente o desenvolvimento inicial das plantas. Os resultados mostraram que ocorreu um atraso de 72 horas no início da expansão das folhas primárias, sendo que a primeira folha trifoliolada não se desenvolveu até o término do experimento. A retirada de 1 cotilédone diminuiu em menor proporção o desenvolvimento do caule e das folhas primárias, e praticamente não alterou o crescimento da primeira folha trifoliolada.

A atividade da redutase do nitrato, expressa em μ moles de NO_2^- , por hora, por folha, nas folhas primárias das plantas intactas é bem maior do que nas plântulas com 1 ou 2 cotilédones removidos. Entretanto, a remoção de apenas 1 cotilédone ocasiona pequenos decréscimos na atividade enzimática da primeira folha trifoliolada.

8. SUMMARY

PARTITIONING OF NITRATE REDUCTASE ACTIVITY DURING THE DEVELOPMENT OF SOYBEAN SEEDLINGS (*Glycine max* L. MERR.)

The pattern of "in vivo" activity of nitrate reductase was determined in soybean seedlings cultivated in a growth chamber under constant temperature and continuous light. Enzyme activity was detected in the cotyledons after approximately 20 hours of light exposure, the values being proportional to the concentration of nitrate in the irrigating solutions. In the cotyledons, the peak of activity was reached after 120 hours of illumination, under 15 mM of nitrate in the nutrient medium. Chlorophyll accumulation paralleled nitrate reductase activities in the cotyledons indicating that nitrate reduction is associated with the development of anabolic processes. Nitrate reductase activity in the cotyledons was inhibited by cycloheximide. On the other hand, actinomycin D did not affect enzyme activity suggesting that the process does depend on "de novo" protein synthesis and is not directly associated with RNA synthesis.

The appearance of enzyme activity in the primary leaves coincided with the time of maximum activity in the cotyledons. By the time nitrate reductase activity started decreasing in the primary leaves, the first trifoliolate show-

ed increasing enzyme activity. Its pattern as determined in leaves showed low values in the early stages of development, reached a peak as the leaves were almost expanded and declined thereafter.

Maximum nitrate reductase activities were calculated as 2,3, 3,2 and 2,2 times higher in leaves infiltrated with nitrate than in the controls without exogenous nitrate, in the cotyledons, primary and first trifoliolate leaves, respectively.

The excision of the two cotyledons, 24 hours after seedling emergence induced inhibition of dry matter accumulation and area of the primary leaves by 78 and 75%, respectively, after 240 hours of exposure to continuous light. There was a 72 hour delay in the expansion of the primary leaves. The first trifoliolate leaf did not develop throughout the experiment. The procedure caused an 81% decrease on dry weight and a 62% on stem height, 336 hours after exposure to continuous light.

The removal of one cotyledon produced minor effect on plant and leaf growth, after 240 hours of exposure to continuous light. The area and dry weight of the primary leaves decreased by 21 and 20%, respectively. There was no effect on the expansion of the first trifoliolate leaf. The height and dry weight of stem diminished 14 and 29%, respectively, 336 hours after exposure to continuous light.

Maximum nitrate reductase activity in the primary leaves decreased 91 and 35%, when the two and one cotyledons were excised, respectively.

9. LITERATURA CITADA

- ABRAHAMSEN, M. e A.M. MAYER, 1967. Photosynthetic and dark fixation of $^{14}\text{CO}_2$ in detached soybeans cotyledons. *Physiol. Plant.* Copenhagen, 20: 1-5.
- AFRIDI, M.M.R.K. e E.J. HEWITT, 1964. The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. I - Effects of nitrate and molybdenum on enzyme activity in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Brotrytis*). *J. Expl. Bot.* Oxford, 15: 251-271.
- AFRIDI, M.M.R.K. e E.J. HEWITT, 1965. The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. II - Effects of enviromental factors, antimetabolites, and amino-acids on induction. *J. Expl. Bot.* Oxford, 16: 628-645.
- ARNON, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* Baltimore, 24: 1-15.
- 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.* Baltimore, 55: 1102-1106.
- ASLAM, M.; R.C. HUFFAKER e R.L. TRAVIS, 1973. The interaction of respiration and photosynthesis in induction of nitrate

- reductase activity. *Plant Physiol.* Baltimore, 52: 137 - 141.
- BEEVERS, L.; D. FLESHER e R.H. HAGEMAN, 1964. Studies on the pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase in higher plants and its relationship to sulfhydryl level. *Biochem. Biophys. Acta.* Amsterdam, 89: 453-464.
- BEEVERS, L.; L.E. SCHRADER; D. FLESHER e R.H. HAGEMAN, 1965. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiol.* Baltimore, 40: 691-698.
- BEEVERS, L. e R.H. HAGEMAN, 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* Palo Alto, 20: 495-522.
- BEEVERS, L., 1976.a. *Nitrogen Metabolism in Plants.* London, Edward Arnold Ltd. 333p.
- BEEVERS, L., 1976.b. Senescence. In: BONNER, J e J. VARNER, Eds. *Plant Biochemistry*, 3^a ed. New York, Academic Press, p. 771-793.
- BRUNETTI, N. e R.H. HAGEMAN, 1976. Comparison of *in vivo* and *in vitro* assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Physiol.* Baltimore, 58: 583-587.
- BURRIS, J.S.; O.T. EDJE e A.H. WAHAB, 1973. Effects of seed size on seedling performance in soybeans. II- Seedling growth and photosynthesis and field performance. *Crop Sci.* Madison, 13: 207-210.
- CANDELA, M.C.; E.G. FISHER e E.J. HEWITT, 1957. Molybdenum as a plant nutrient. X - Some factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plants grown with different nitrogen sources and molybdenum levels in sand culture. *Plant Physiol.* Baltimore, 32: 280-288.

- CHANTAROTWONG, W.; R.C. HUFFAKER; 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.* Baltimore, 57: 519-522.
- CHEN, T.M. e S.K. RIES, 1969. Effect of light and temperature on nitrate uptake and nitrate reductase activity in rye and oat seedlings. *Can. J. Bot.* Ottawa, 47: 341-343.
- CHIN, H.F. e Y. AITKEN, 1976. Effect of seed damage on growth and development in pea (*Pisum sativum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann. Bot.* London, 40: 91-98.
- CHIN, H.F.; T.F. NEALES e J.H. WILSON, 1977. The effects of cotyledon excision on growth and leaf senescence in soybean plants. *Ann. Bot.* London, 41: 771-777.
- EDWARDS, C.J. e E.E. HARTWING, 1971. Effects of seed size upon rate of germination in soybeans. *Agron. J.* Madison, 63: 429-430.
- ELLIS, R.J. e I.R. MACDONALD, 1970. Specificity of cicloheximide in higher plants systems. *Plant Physiol.* Baltimore, 46: 227-232.
- EPSTEIN, E., 1972. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. New York, John Wiley and Sons. 412p.
- EVANS, H.J. e A. NASON, 1953. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extrats of higher plants. *Plant Physiol.* Baltimore, 28: 233-254.
- FAIR, P.; J. TEW e C.F. CRESSWELL, 1973. Enzyme activities associated with carbon dioxide exchange in illuminated leaves of *Hordeum vulgare* L. I - Effects of light period, leaf age, and position, on carbon dioxide compensation point. *Ann. Bot.* London, 37: 831-844.

- FERRARI, E.T.; O.C. YODER e P. FILNER, 1973. Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: Evidence for two nitrate pools. *Plant Physiol.* Baltimore, 51: 423-431.
- GREEN, D.G. e T.W. SUDIA, 1969. Germination and seedling development of soybeans in a carbon dioxide-deficient atmosphere. *Amer. J. Bot.* Baltimore, 56: 1018-1022.
- HAGEMAN, R.H. e D. FLESHER, 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.* Baltimore, 35: 700-708.
- HAGEMAN, R.H.; D. FLESHER e A. GITTER, 1961. Diurnal variations and other light effects influencing the activity of nitrate reductase and nitrogen metabolism in corn. *Crop Sci.* Madison, 1: 201-204.
- HAIDLE, C.W. e R. STORCK, 1966. Inhibition by cicloheximide of protein and RNA synthesis in *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* New York, 22: 175-180.
- HARPER; J.E., 1971. Seasonal nutrient uptake and accumulation patterns in soybeans. *Crop. Sci.* Madison, 11: 347-350.
- HARPER, J.E. e R.H. HAGEMAN, 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiol.* Baltimore, 49: 146-154.
- HARPER, J.E.; J.C. NICHOLAS e R.H. HAGEMAN, 1972. Seasonal and canopy variation in nitrate reductase activity of soybeans (*Glycine max* L. Merr.) varieties. *Crop Sci.* Madison, 12: 382-386.
- HEIMER, Y.M. e P. FILNER, 1971. Regulation of nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III- The nitrate uptake system. *Biochim. Biophys. Acta.* Amsterdam, 230: 362-372.
- HEWITT, E.J. e M.M.R.K. AFRIDI, 1959. Adaptive synthesis of nitrate reductase in higher plants. *Nature.* London, 183: 57-58.

- HEWITT, E.J.; B.A. NOTTON e M.M.R.K. AFRIDI, 1967. Comparative effects of some antimetabolites on ribonucleic acid synthesis and induction on nitrate reductase in cauliflower leaf tissues. *Plant & Cell Physiol.* Kyoto, 8: 385-397.
- HEWITT, E.J.; D.P. HUCKLESBY e B.A. NOTTON, 1976. Nitrate metabolism. In: BONNER, J. e J. VARNER, Eds. *Plant Biochemistry*, 3^a ed. New York, Academic Press, p. 633-681.
- HEWITT, E.J., 1977. International Symposium of Nitrogen Assimilation in Plants, Long Ashton, England. Setembro.
- HOAGLAND, D.R. e D.I. ARNON, 1939. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Univ. of Calif. Agr. Exp. Sta.* Berkeley, 347: 1-39.
- IHLE, J.N. e L.S. DURE III, 1972. The developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. III Regulation of the biosynthesis of enzymes utilized in germination. *J. Biol. Chem.* Baltimore, 247: 5048-5055.
- INGLE, J.; K.W. JOY e R.H. HAGEMAN, 1966. The regulation of the enzymes included in the assimilation of nitrate by higher plants. *Biochem. J.* London, 100: 577-588.
- INGLE, J., 1968. Nucleic acids and protein synthesis associated with the induction of nitrate reductase activity in radish cotyledons. *Biochem. J.* London, 108: 715-724.
- JACKSON, W.A.; D. FLESHER e R.H. HAGEMAN, 1973. Nitrate uptake by dark-grown seedlings. *Plant Physiol.* Baltimore, 51: 120-127.
- JONHSON, D.R. e V.D. LUEDDERS, 1974. Effects of planted seed size on emergence and yield of soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Agron. J.* Madison, 66: 117-118.
- JORDAN, W.R. e R.C. HUFFAKER, 1972. Influence of age and light on the distribution and development of nitrate reductase in geening barley leaves. *Physiol. Plant.* Copenhagen, 26: 296-301.

- KANNANGARA, C.G. e H.W. WOOLHOUSE, 1967. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Perilla frutescens*. *New Phytol.* Oxford, 66: 553-561.
- KERRIDGE, D., 1958. The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acids and protein synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Gen. Microb.* London, 19: 497-506.
- KILLEEN, L.A. e L.A. LARSON, 1968. The effect of cotyledon excision on the growth of pea seedlings. *Amer. J. Bot.* Baltimore, 58: 961-965.
- KLEPPER, L.; D. FLESHER e R.H. HAGEMAN, 1971. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.* Baltimore, 48: 580-590.
- LEHNINGER, A.L., 1970. *Biochemistry*. New York, Worth Publishers, 680 p.
- MAGALHÃES, A.C., 1973. Temperature stress effects on growth and nitrogen assimilation of soybeans (*Glycine max* L. Merr.) seedlings. Urbana Champaign, University of Illinois 199 p. (Ph. D. Thesis).
- MAGALHÃES, A.C., 1975. Nitrate assimilation in higher plants. *What's New in Plant Physiology* 7: 1-5.
- MCALISTER, D.F. e O.A. KROBER, 1951. Translocation of food reserves from soybean cotyledons and their influence on the development of the plant. *Plant Physiol.* Baltimore, 26: 525-538.
- MIRANDA, M.A.C.; S. MIYASAKA; H.A.A. MASCARENHAS e D. ROSSETO, 1977. Melhoramento da soja no Estado de São Paulo. In: *A Soja no Brasil Central*. Fundação Cargill, p.24-54.

- MOORE, T.C., 1964. Effects of cotyledon excision on the flowering of five varieties of *Pisum sativum*. *Plant. Physiol.* Baltimore, 39: 924-927.
- MOORE, T.C., 1967. Gibberellin relationships in the "Alaska" pea (*Pisum sativum*). *Amer. J. Bot.* Baltimore, 54: 262-269.
- MORRIS, I., 1966. Inhibition of protein synthesis by cicloheximide (actidione) in *Chlorella*. *Nature*. London, 211 : 1190-1192.
- NICHOLAS, J.C.; J.E. HARPER e R.H. HAGEMAN, 1976.a. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). I- Effects of light and temperature. *Plant Physiol.* Baltimore, 58: 731-735.
- NICHOLAS, J.C.; J.E. HARPER e R.H. HAGEMAN, 1976.b. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). II- Energy limitations. *Plant Physiol.* Baltimore, 58: 736-739.
- PATE, J.S., 1968. Physiological aspects of inorganic and intermediate nitrogen metabolism (with special reference to the legume, *Pisum arvense* L.). In: HEWITT, E.J. e C.V. CUTTING, Eds. *Recent Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants*. New York, Academic Press, p. 219-240.
- RADIN, J.W., 1974. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. *Plant Physiol.* Baltimore, 53: 458-463.
- RADIN, J.W. e R.N. TRELEASE, 1976. Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. I - Nitrate reductase and isocitrate lyase. *Plant Physiol.* Baltimore, 57: 902-905.
- RIJVEN, A.H.G.C., 1958. Effects of some inorganic nitrogenous substances on growth and nitrogen assimilation of young plants embryos *in vitro*. *Austr. J. Biol. Sci.* Melbourne, 11: 142-154.

- SANDERSON, G.W. e E.C. COCKING, 1964. Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. I - Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Physiol.* Baltimore, 39: 416-422.
- SARRUGE, J.R., 1975. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica.* Piracicaba, 1: 231-233.
- SAWHNEY, S.K. e M.S. NAIK, 1972. Role of light in the synthesis of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings. *Biochem. J.* London, 130: 475-485.
- SAWHNEY, S.K. e M.S. NAIK, 1973. Effect of chloramphenicol and cicloheximide on the synthesis of nitrate reductase and nitrite reductase in rice leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* New York, 51: 67-73.
- SCHRADER, L.E.; G.L. RITENOUR; G.L. EILRICH e R.H. HAGEMAN, 1968. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.* Baltimore, 43: 930-940.
- SCHRADER, L.E.; D.A. CATALDO; D.M. PETERSON e R.D. VOGELZANG, 1974. Nitrate reductase and glucose - 6 - phosphate dehydrogenase activities as influenced by leaf age and addition of protein to extraction media. *Physiol. Plant.* Copenhagen, 32: 337-341.
- SHANER, D.L. e J.S. BOYER, 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I - Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.* Baltimore, 58: 499-504.
- SHIBLES, R.; I.C. ANDERSON e A.H. GIBSON, 1975. Soybean. In: EVANS, L.T., ed. *Crop Physiology.* Cambridge, Cambridge University Press, p. 151-189.
- SIEGEL, M.R. e H.D. SISLER, 1963. Inhibition of protein synthesis *in vitro* by cicloheximide. *Nature.* London, 200: 675-676.
- SLUITERS-SCHOLTEN, C.M. TH., 1973. Effect of chloramphenicol and cicloheximide on the induction of nitrate and nitrite reductase in bean leaves. *Planta.* Berlin, 113: 229-240.

- SLUITERS-SCHOLTEN, C.M.TH., 1975. Photosynthesis and the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in bean leaves. *Planta*. Berlin, 123: 175-184.
- SMITH, F.W. e J.F. THOMPSON, 1971.a. Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. *Plant Physiol.* Baltimore, 48: 219-223.
- SMITH, F.W. e J.F. THOMPSON, 1971.b. Regulation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* Baltimore, 48: 224-227.
- SRIVASTAVA, H.S., 1975. Distribution of nitrate reductase in ageing bean seedling. *Plant & Cell Physiol.* Kyoto, 16: 995-999.
- STREETER, J.G., 1972.a. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants: I - Seasonal variation in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. *Agron. J.* Madison, 64: 311-314.
- STREETER, J.G., 1972.b. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants: II - Seasonal variations in nitrate reductase, glutamate dehydrogenase and nitrogen constituents of plant parts. *Agron. J.* Madison, 64: 315-318.
- STREETER, J.G. e M.E. BOSLER, 1972. Comparison of "in vitro" and "in vivo" assays for nitrate reductase in soybean leaves. *Plant Physiol.* Baltimore, 49: 448-450.
- TANG, P.S. e H.Y.WU, 1957. Adaptive formation of nitrate reductase in rice seedlings. *Nature*. London, 279: 1355-1356.
- TINGEY, D.T.; R.C. FITES e J. BAHARSJAH, 1974. Factors influencing nitrate reduction in soybean foliage. *New Phytol.* Oxford, 73: 21-29.
- TRAVIS, R.L.; W.R. JORDAN e R.C. HUFFAKER, 1969. Evidence for an inactivating system of nitrate reductase in *Hordeum vulgare* L. during darkness that requires protein synthesis. *Plant Physiol.* Baltimore, 44: 1150-1156.

- TRAVIS, R.L.; R.C. HUFFAKER e J.L. KEY, 1970.a. Light-induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves. *Plant Physiol.* Baltimore, 46:800-805.
- TRAVIS, R.L.; W.R. JORDAN e R.C. HUFFAKER, 1970. b. Light and nitrate requirement for induction of nitrate reductase activity in *Hordeum vulgare*. *Physiol.Plant.* Copenhagen, 23: 678-685.
- TRAVIS, R.L. e J.L. KEY. 1971. Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase in dark-grown corn seedlings. *Plant Physiol.* Baltimore, 48: 617-620.
- VEGA, J.M.; J. HERRERA; P.J. APARICIO; A. PANEQUE e L. LOSADA, 1971. Role of molybdenum in nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.* Baltimore, 48: 294-299.
- WALLACE, W. e J.S. PATE, 1965. Nitrate reductase in field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. Bot.* London, 29: 655-671.
- WEBER, C.W. e B.E.CALDWELL, 1966. Effects of defoliation and stem bruising on soybeans. *Crop Sci.* Madison, 6: 25-27.
- ZIELKE, H.R. e P. FILNER, 1971. Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. *J. Biol. Chem.* Baltimore, 246: 1722-1779.
- ZIESERL, J.F.; W.L. RIVENBARK e R.H. HAGEMAN, 1963. Nitrate reductase activity, protein content, and yield of four maize hibrids at varying plant population. *Crop Sci.* Madison, 3: 27-32.