

JAILSON LOPES CRUZ

Efeitos de Níveis do Nitrato Sobre o Metabolismo do  
Nitrogênio, Assimilação do CO<sub>2</sub> e Fluorescência  
da Clorofila *a* em Mandioca

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia  
Vegetal, para a obtenção do título de “Doctor  
Scientiae”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

JAILSON LOPES CRUZ

Efeitos de Níveis do Nitrato Sobre o Metabolismo do  
Nitrogênio, Assimilação do CO<sub>2</sub> e Fluorescência  
da Clorofila *a* em Mandioca

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia  
Vegetal, para a obtenção do título de “Doctor  
Scientiae”

**APROVADA: 03 de agosto de 2001**

Prof. Fábio Murilo Da Matta  
Huamán

(Conselheiro)

Prof. Carlos A. Martinez y

(Conselheiro)

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva  
Oliveira

Prof. Luiz Edson Mota de

Prof. Paulo Roberto Mosquim  
(Orientador)

Senhor, muito obrigado pelo meu lar. É tão maravilhoso ter um lar.  
Não é importante se esse lar é uma mansão, ou uma tapera  
se é um ninho, uma casa na favela,  
um bangalô, seja lá o que for  
mas é importante que dentro dele  
exista a figura do amor.  
Amor de mãe ou de pai, de mulher ou de marido  
de filho ou de irmão  
a presença de um amigo  
alguém que nos dê a mão  
pelo menos a companhia de um cão  
porque é tão doloroso, viver na solidão.  
Mas se Eu a ninguém tiver para amar  
nem um teto para me agasalhar  
Ou uma cama para me deitar  
nem assim reclamarei, e nem blasfemarei  
ao contrário te direi, obrigado senhor porque eu nasci  
Muito obrigado porque eu creio em ti  
Pelo teu amor, obrigado Senhor

O texto acima é parte de um poema declamado por Divaldo Pereira Franco\*, em algumas de suas palestras. Procuro sempre aplicá-lo como filosofia de vida.

\*Divaldo Pereira Franco cursou a escola primária e o curso normal rural em Feira de Santana, onde nasceu. Já realizou cerca de 8.500 palestras, em mais de 1.000 cidades, inclusive por cinco vezes na ONU. Já psicografou mais de 140 livros, totalizando, aproximadamente, 4 milhões de exemplares, traduzidos para mais de catorze idiomas. Toda a renda dos livros, e de outras atividades, Ele reveste para a Mansão do Caminho, a gigantesca obra social e educacional, em Salvador. Por sua instituição já foram atendidas mais de 50.000 crianças carentes.

O presente trabalho, fruto do esforço de vários anos, dedico, com muito carinho:

Aos meus pais Matias Gomes da Cruz e Maria Lopes da Cruz, pelo amor, incentivo, exemplo de honestidade e amor ao próximo e pelos constantes

sacrifícios realizados durante todo o processo de minha longa formação. Vocês são os maiores responsáveis pelo objetivo ora conseguido.

À minha esposa Claudinéia e minhas filhas Deborah e Maria Cláudia, donas do meu coração e razão maior da minha vida.

Aos meus irmãos Jorge, Zélia, Zé Hamilton, Jaci, Janda, Deide e Messias pelo carinho e amizade durante todos esses anos em que estivemos convivendo. Que nossa amizade seja eterna. Dedicção especial a Zé Hamilton que, com seus exemplos, fez crescer em mim a importância da solidariedade.

#### AGRADECIMENTOS:

Ao Professor Paulo Roberto Mosquim pela orientação segura, pela amizade e pelos exemplos de competência e de capacidade profissional.

Ao Professor Fábio Murilo Da Matta pelas críticas, sugestões, amizade e pelos exemplos de competência e de capacidade profissional.

A Claudinéia pelo amor, compreensão e ajuda na condução das atividades experimentais.

Aos professores Carlos Alberto Martinez y Huamán, Marco Aurélio Pedron e Silva e Luiz Edson Mota de Oliveira pelas sugestões apresentadas à redação final do texto.

Aos amigos Marlos e Luciene, Prof. Raimundo dos Santos Barros, Jay e Dra. Santana, Vespasiano e Mônica, Mercês e Prof. Marcelo Loureiro, pela amizade e alegre convivência durante o desenvolvimento do curso.

Aos funcionários do departamento de Biologia Vegetal, especialmente Carlos Raimundo, Rogério e Geraldo, pelo auxílio na realização das atividades de pesquisa.

Ao estudante Wagner Luiz Araújo cuja ajuda foi de grande valia para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo

À EBDA e a EMBRAPA/CNPq pela oportunidade de realização do curso

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Jailson Lopes Cruz, filho de Matias Gomes da Cruz e Maria Lopes da Cruz, nasceu em Conceição do Almeida, Estado da Bahia, em 20 de setembro de 1960.

Em Março de 1979, iniciou o curso de Engenharia Agrônoma na Universidade Federal da Bahia, concluindo-o em dezembro de 1982.

Em 1983, foi contratado pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Bahia, onde desenvolveu atividades até o ano de 1985. Em 1986 foi transferido para a Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia, hoje denominada Empresa de Desenvolvimento Agropecuário da Bahia (EBDA).

Iniciou o curso de Pós graduação, em nível de mestrado, em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, na Escola Superior de Agricultura de Lavras, hoje denominada Universidade Federal de Lavras, em março de 1990, concluindo-o em agosto de 1992.

Em dezembro de 1998, foi contratado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, para exercer atividades de pesquisa no Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura.

A partir de março de 1997, iniciou o curso de Pós Graduação, em nível de Doutorado, em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em agosto de 2001.

## ÍNDICE

RESUMO .....

viii

ABSTRACT.....

x

INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Regulação da absorção do NO <sub>3</sub> .....	4
Redução do NO <sub>3</sub> e assimilação do NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	6
O nitrogênio e a assimilação do carbono .....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
Condução dos experimentos.....	14
EXPERIMENTO n <sup>o</sup> 1 .....	14
Crescimento das plantas.....	14
Taxa fotossintética líquida.....	16
Fósforo inorgânico .....	17
Frações de açúcares e de nitrogênio .....	17
Proteínas solúveis totais.....	18
Massa seca .....	19
EXPERIMENTO n <sup>o</sup> 2 .....	19
Trocas gasosas .....	20
Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	20
Concentração de clorofilas.....	21
Atividade das enzimas.....	22
Redutase do nitrato .....	22
Sintetase da glutamina.....	23
Desidrogenase do glutamato dependente de NADH.....	23
Sintase do glutamato dependente de ferredoxina.....	24

Invertases .....	25
Sintase da sacarose.....	25
Análise estatística.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
Efeito do nitrato sobre o metabolismo do nitrogênio .....	27
Efeito do nitrato sobre a alocação, partição e assimilação do carbono.....	40
Efeito do nitrato sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	53
RESUMO E CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

## RESUMO

CRUZ, JAILSON LOPES, D.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Efeitos de níveis do nitrato sobre o metabolismo do nitrogênio, assimilação do CO<sub>2</sub> e fluorescência da clorofila *a* em mandioca.** Orientador: Paulo Roberto Mosquim. Conselheiros: Fábio Murilo Da Matta e Carlos Alberto Martínez y Huamán

Plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz ‘Cigana Preta’) foram cultivadas com diferentes concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, para avaliar-se possíveis alterações no metabolismo do nitrogênio, assimilação do CO<sub>2</sub> e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*. Os experimentos foram conduzidos em solução nutritiva, em blocos ao acaso. Após 90 dias de cultivo, verificou-se que os níveis de nitrogênio foliar total e de suas frações (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, aminoácidos e proteínas solúveis), bem como as atividades das enzimas redutase do nitrato, desidrogenase do glutamato, sintetase da glutamina e sintase do glutamato foram reduzidas pela menor disponibilidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no meio de cultivo. Nas folhas, os teores de açúcares solúveis totais, de açúcares não-redutores e de fósforo inorgânico, aumentaram linearmente, com o incremento dos níveis NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mas os níveis de amido e açúcares redutores diminuíram. Nas raízes de absorção e raízes tuberosas, os níveis de amido e açúcares redutores também foram maiores para as plantas cultivadas sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ocasionou reduções nas taxas fotorrespiratória e fotossintética líquida e, paralelamente, proporcionou aumento na taxa respiratória total. A manutenção dos valores de C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, F<sub>v</sub>’/F<sub>m</sub>’ e aumento nos níveis de redução de Q<sub>A</sub>, verificados nas plantas cultivadas sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, indicaram que a menor taxa fotossintética líquida, por unidades de área e de massa, não foi devida a limitações estomáticas e tampouco ao funcionamento da etapa fotoquímica, mas em função: (i) da menor concentração de proteínas, presumivelmente aquelas relacionadas com a etapa bioquímica da fotossíntese, (ii) da menor taxa de

carboxilação da Rubisco, (iii) da menor disponibilidade de Pi e, (iv) da retroinibição devida ao acúmulo de açúcares redutores.

## ABSTRACT

CRUZ, JAILSON LOPES, D.S., Universidade Federal de Viçosa. August, 2001.  
**Effects of different nitrate levels on nitrogen metabolism, CO<sub>2</sub> assimilation and chlorophyll *a* fluorescence parameters in cassava plants.** Adviser: Paulo Roberto Mosquim. Advisory Committee: Fábio Murilo Da Matta and Carlos Alberto Martinez y Huamán

Cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz 'Cigana Preta') were grown with nitrate in different levels (0.5; 3.0, 6.0 and 12.0 mol m<sup>-3</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) to evaluate possible alterations in nitrogen metabolism, CO<sub>2</sub> assimilation and chlorophyll *a* fluorescence parameters. Experiments were conducted in nutrients solution, in a randomized block design. After 90 days of cultivation, total leaf nitrogen concentration and its fractions (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, aminoacids and soluble proteins), as well as the activities of nitrate reductase, glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase were decreased in the plants under lowest nitrate level treatments. In leaves, concentration of total soluble sugars, non-reducing sugars and inorganic phosphate increased linearly along with nitrate levels, whilst starch and reducing sugars decreased. In both absorbing and tuberous roots, concentration of starch and reducing sugars were higher in plants grown under nitrate deficiency. Such a deficiency also led to reductions in photorespiratory rates and net CO<sub>2</sub> assimilation, but an opposite trend in total respiration rate was found. Maintenance of (i) internal to ambient CO<sub>2</sub> ratio, (ii) both dark and light-adapted variable to maximum chlorophyll fluorescence ratio and (iii) an increase in the reduction state of Q<sub>A</sub> under nitrate deficiency suggested that decreased net CO<sub>2</sub> assimilation, on both area and mass bases, was a consequence of biochemical limitations, due possibly to (i) a decreased concentration of proteins, presumably the ones associated with the Calvin cycle, (ii) a decreased rate of Rubisco carboxylation, (iii) a decline in Pi availability and, (iv) an end-product inhibition owing to the reducing sugars accumulation.

## INTRODUÇÃO

A mandioca, apesar de ser uma planta  $C_3$ , tem sido considerada como uma espécie bastante eficiente no uso dos fatores ambientais, apresentando razoável capacidade de produção de massa seca, mesmo quando cultivada sob escassez de água e de nutrientes.

Apesar da constatação de que o fornecimento natural de nitrogênio pelos solos tropicais é bastante limitado, a prática correta da adubação nitrogenada não é utilizada por parte significativa dos agricultores que cultivam a mandioca. Isso indica que, em grande parte da área cultivada, o crescimento e o desenvolvimento da mandioca ocorrem sob condições de deficiência de nitrogênio. Esse fato, aliado a outros, como deficiência de água e de fósforo, faz com que a produtividade da mandioca no Brasil gire em torno de  $14 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  (IBGE, 1995), enquanto a produtividade potencial da cultura é superior a  $60 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  (COCK, 1976). Vale ressaltar que a ausência ou prática inadequada da adubação nitrogenada não ocorre apenas nos plantios de mandioca, já que o nitrogênio tem sido considerado como um dos elementos que mais tem limitado a produção de biomassa nos ecossistemas naturais, florestais e comerciais (GREENWOOD et al. 1991), especialmente nos trópicos.

O nitrogênio é um nutriente necessário à formação de diversas moléculas de suma importância para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Dentre essas moléculas, é possível destacar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e clorofilas. A deficiência de nitrogênio, portanto, pode causar sérios distúrbios ao metabolismo celular.

Quando a concentração de nitrogênio na planta está abaixo de um determinado nível crítico, a taxa de formação de novas folhas é baixa, devido à redução na atividade do meristema apical (TOLLEY-HENRY & RAPER, 1986). Além disso, a expansão das folhas em crescimento também é comprometida (RADIN & BOYER, 1982), acarretando, como consequência, menor área foliar e menor capacidade de interceptação da radiação solar. A deficiência de nitrogênio, além de reduzir o crescimento, também pode afetar a partição de assimilados entre as diferentes partes da planta, ocasionando, via de regra, um aumento na relação entre a massa seca das raízes e a massa seca da parte aérea.

Plantas cultivadas com uma quantidade inadequada de nitrogênio normalmente não expressam o seu potencial produtivo, visto que, sob tais condições, podem ocorrer reduções significativas na taxa assimilatória líquida (EVANS, 1989). O efeito negativo da deficiência de nitrogênio sobre a fotossíntese pode estar relacionado, dentre outros fatores, à redução no conteúdo de clorofila (CIOMPI et al., 1996), redução na quantidade de tecido paliçádico (KOZLOWSKI & PALLARDY, 1997), redução da atividade de algumas enzimas do ciclo redutivo do carbono (SUGIHARTO et al., 1990) e do nitrogênio (DELÚ FILHO, 1994) e redução na condutância estomática ao vapor d'água (GUIDI et al., 1998). Em relação à fase fotoquímica da fotossíntese, tem-se verificado que, sob limitação de nitrogênio, pode ocorrer uma redução substancial na eficiência do fotossistema II (KOLBER et al., 1988); outros autores, contudo, mostram que essa eficiência não é afetada significativamente pela deficiência de nitrogênio (e.g., HÁK et al., 1993; CECHIN, 1998). Indiretamente, o suprimento inadequado de nitrogênio também pode reduzir a fotossíntese e, conseqüentemente, o crescimento da planta, por dificultar a absorção e utilização de outros elementos minerais, que são de capital importância para o metabolismo da planta como um todo (KHAMIS & LAMAZE, 1990; PEUKE et al., 1994).

Apesar de ser comum a ocorrência de plantios de mandioca em solos com algum grau de deficiência de nitrogênio, os trabalhos visando avaliar-se as suas conseqüências negativas sobre a fisiologia e a produtividade dessa cultura ainda

são bastante escassos e alguns deles bastante contraditórios. Por exemplo, os estudos de SANTANNA et al. (1975) e MORAES et al. (1981) mostraram que a fertilização nitrogenada pode causar aumento na produtividade econômica da mandioca, enquanto GOMES & HOWELLER (1984) verificaram que a mandioca não responde à fertilização nitrogenada, havendo, em alguns casos, a redução do rendimento econômico pela aplicação desse nutriente. Diversos fatores podem estar envolvidos nessas respostas diferenciadas, inclusive a possibilidade de existirem diferenças varietais na eficiência do uso de nitrogênio.

Em algumas regiões do Brasil, a expressão econômica e social decorrente do cultivo da mandioca é muito alta, principalmente no nordeste, onde ela é cultivada por grande parte dos agricultores. Assim, em função da importância dessa cultura e dada a escassez de informação sobre o tema acima discutido, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do nitrogênio sobre a fotossíntese, alocação do carbono e do nitrogênio absorvido, produção de massa seca das diferentes partes da planta e sobre algumas enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono e do nitrogênio.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 - REGULAÇÃO DA ABSORÇÃO DO $\text{NO}_3^-$

O nitrogênio requerido para o crescimento normal de muitas plantas é originado, basicamente, da absorção de nitrato pelo sistema radicular. Apesar da importância desse processo, os mecanismos envolvidos na regulação da absorção desse íon ainda são pouco conhecidos (IMSANDE & TOURAINE, 1994; SEHTIYA & GOYAL, 2000).

Quando plantas são cultivadas sob condições de deficiência de nitrogênio, quantidades relativamente maiores de assimilados são desviados para o crescimento radicular, possibilitando a aquisição de maiores quantidades de nitrogênio. Por exemplo, plantas de trigo cultivadas sob deficiência de nitrogênio apresentaram concentrações de carboidratos nas raízes maiores do que as de plantas cultivadas sob disponibilidade adequada desse nutriente (TALOUIZTE et al., 1984b). O maior acúmulo de carboidratos, segundo esses autores, foi usado para a promoção do crescimento radicular. EGHBALL & MARANVILLE (1993) observaram que, tanto em condições de campo como em casa de vegetação, a deficiência de nitrogênio aumentou o comprimento e a massa seca do sistema radicular de alguns genótipos de milho. Para aqueles autores, sistemas radiculares mais volumosos, associados à deficiência de nitrogênio, podem possibilitar maior exploração de camadas mais profundas do solo e extrair maiores quantidades de nitrogênio. Os mecanismos relacionados a esse crescimento diferencial do sistema radicular, sob concentração variada de

nitrogênio, não estão totalmente esclarecidos, mas existe a possibilidade de que fatores hormonais e a partição de carbono e nitrogênio entre a raiz e a parte aérea possam estar envolvidos (Van der WERF & NAGEL, 1996).

A absorção de  $\text{NO}_3^-$  ocorre por um processo ativo, ou seja, envolve o transporte de  $\text{NO}_3^-$  para o interior das células da raiz, contra um gradiente de potencial eletroquímico, através de um sistema simporte, com a absorção simultânea de  $2\text{H}^+$  (MARSCHNER, 1995). Citações de IMSANDE & TOURAINE (1994) sugerem que a absorção de 1 mol de  $\text{NO}_3^-$  consome cerca de 1 a 2 moles de ATP, o que corresponderia a 5% do catabolismo do carbono radicular e a 10% do processo de redução e assimilação do  $\text{NO}_3^-$ .

A absorção ativa do  $\text{NO}_3^-$  é mediada por transportadores localizados na membrana plasmática e que se diferenciam por suas propriedades cinéticas. Estudos com influxo de  $\text{NO}_3^-$  em cevada, por exemplo, evidenciaram a existência de três sistemas de transportadores: sob alta concentração de  $\text{NO}_3^-$  no meio de cultivo, opera um sistema de baixa afinidade, constitutivo, e que não sofre regulação; contudo, sob baixa concentração de nitrato, operam dois sistemas de alta afinidade, um constitutivo e com  $K_m$  para  $\text{NO}_3^-$  de aproximadamente  $7 \mu\text{M}$  e outro, que sofre regulação e tem um  $K_m$  de aproximadamente  $15\text{-}34 \mu\text{M}$  (ASLAM et al., 1992; KING et al., 1993). Estudos com *Vicia faba* também sugerem a existência de pelo menos dois transportadores de nitrato com alta e baixa afinidade (SANCHEZ-GUERREIRO et al., 1998).

A magnitude da absorção de  $\text{NO}_3^-$  é fortemente influenciada por fatores do ambiente e pelos níveis de alguns metabólitos nitrogenados na solução nutritiva e, ou, na planta (MULLER & TOURAINE, 1992; KING et al., 1993). Dada às características da redutase do nitrato, a taxa de absorção do  $\text{NO}_3^-$  normalmente excede a capacidade de sua redução, fazendo com que esse íon se acumule (SOLOMONSON & BARBER, 1990) e exerça algum tipo de regulação sobre os seus próprios transportadores (SIDDIQI et al., 1989). Usando mutantes com capacidade limitada para reduzir o  $\text{NO}_3^-$ , KING et al. (1993) indicaram que o reservatório de  $\text{NO}_3^-$ , *per se*, foi capaz de controlar a atividade dos transportadores e, portanto, do influxo de nitrato para as raízes. HOLE et al.

(1990) e TEYKER et al. (1988) também verificaram que, em milho e em cevada, o sistema de absorção de nitrato só se expressa integralmente se houver um contato dos transportadores com seu substrato. Corroborando esses resultados, SIDDIQI et al. (1989) observaram interação significativa entre o reservatório de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes e a sua taxa de absorção.

Alguns autores, no entanto, têm sugerido que a regulação da expressão dos transportadores de alta afinidade é realizada por compostos originados da assimilação do amônio e não pelo nitrato ou amônio (LEE et al., 1992; IMSANDE & TOURAINÉ, 1994). Entretanto, KING et al. (1993) sugerem que dada à complexidade do metabolismo do nitrogênio, que envolve diversos compostos e diversos compartimentos celulares na raiz e na folha, não é possível se descartar a possibilidade de que o nitrato ou o amônio sejam moduladores da absorção do nitrato.

## 2 - REDUÇÃO DO $\text{NO}_3^-$ e ASSIMILAÇÃO DO $\text{NH}_4^+$

O  $\text{NO}_3^-$  absorvido da solução do solo pode ser armazenado no vacúolo das células da raiz ou transportado, via xilema, para a parte aérea, onde pode ser armazenado. Tanto a raiz quanto a parte aérea também podem ser sítios de redução do  $\text{NO}_3^-$ . Mesmo quando o influxo de  $\text{NO}_3^-$  é extremamente baixo, pode ocorrer alguma atividade de redução, porque o  $\text{NO}_3^-$  armazenado é liberado para o reservatório metabólico, no citoplasma, onde ele é reduzido (KING et al., 1992).

A composição da seiva do xilema pode fornecer indícios da localização preferencial da redução do nitrato entre as diferentes espécies (PATE, 1972). Plantas como *Xanthium*, que apresentam altas concentrações de nitrato na seiva xilemática, realizam o processo de redução na parte aérea (SIVASANKAR & OAKS, 1996). Ao contrário, plantas como seringueira, cujos sítios preferenciais de redução do  $\text{NO}_3^-$  são as raízes, devem transportar grandes quantidades de nitrogênio reduzido (DELÚ FILHO, 1994). Contudo, essa avaliação, quando realizada de forma isolada, pode induzir a erros de interpretação, uma vez que

algumas plantas, mesmo reduzindo o  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea, podem transportar quantidades significativas de nitrogênio reduzido, originadas da degradação de proteínas que, sob certas condições, pode ocorrer nas raízes (JACKSON et al., 1976). Além disso, existem espécies que reduzem o  $\text{NO}_3^-$  tanto na parte aérea quanto nas raízes (PATE, 1980).

Íons nitrato absorvidos da solução do solo são reduzidos a  $\text{NO}_2^-$  pela redutase do nitrato (RN) e posteriormente reduzidos a amônio, pela redutase do nitrito (RNi). As duas enzimas, apesar de atuarem seqüencialmente, estão localizadas em compartimentos celulares diferentes, a primeira no citossol e a RNi, nos plastídios (WALLSGROVE et al., 1979).

A regulação da atividade da RN pode ser exercida por diversos fatores, tais como: luz, compostos nitrogenados e reguladores de crescimento (GALANGAU et al., 1988; LU et al., 1990; SIVASANKAR & OAKS, 1996). No entanto, a luz e o  $\text{NO}_3^-$  têm sido indicados como os principais responsáveis pela regulação da RN (OELMULLER & BRIGGS, 1991; LI & OAKS, 1995). A regulação da atividade dessa enzima pode ser exercida tanto no controle dos níveis de produção da proteína quanto por modificações que podem ser induzidas após a sua formação (GALANGAU et al., 1988).

Em cotilédones de girassol, formados sob iluminação, a atividade da RN não foi detectada na ausência de  $\text{NO}_3^-$ ; após a adição desse íon ao meio de crescimento, ocorreu a indução e o aparecimento da atividade da RN (CABELLO et al., 1998). De forma semelhante, os níveis da atividade e da concentração da enzima, em tomate e em fumo, foram caracterizados por uma diminuição dramática logo após a retirada do  $\text{NO}_3^-$  do meio de cultivo (GALANGAU et al., 1988). Para esses últimos autores, o mecanismo pelo qual não ocorreria formação da proteína em plantas deficientes de  $\text{NO}_3^-$  estaria relacionado à necessidade do  $\text{NO}_3^-$  para tradução do mRNA e, ou, para a proteção contra a sua degradação. Também existe a possibilidade de que o  $\text{NO}_3^-$  seja essencial para evitar que a proteína perca a atividade devido à ocorrência do processo de fosforilação e interação com a proteína inibidora 14-3-3 (BACHMANN et al., 1996). Contudo, tem-se verificado que, mesmo entre os

diferentes genótipos de uma mesma espécie, a regulação da RN pelo nitrato pode não seguir o mesmo padrão. Em milho, por exemplo, os resultados obtidos mostraram que alguns híbridos apresentaram aumento na atividade da RN, em resposta ao aumento da nutrição nítrica, enquanto em outros houve, inclusive, redução na atividade daquela enzima (PURCINO et al., 1998).

Os metabólitos originados do processo de redução e assimilação do  $\text{NO}_3^-$  também podem agir como moduladores da expressão gênica da RN (FAURE et al., 1991). Com efeito, MIGGE et al. (1997) observaram que a aplicação de amônio proporcionou um aumento significativo na concentração de aminoácidos e, ao mesmo tempo, contribuiu para redução dos níveis de mRNA da RN. Além disso, a aplicação de glutamina ou asparagina pode anular o efeito benéfico do nitrato sobre a atividade da RN (SIVASANKAR & OAKS, 1995). A regulação da expressão dos genes da RN, por compostos nitrogenados, tem sido explicada como uma estratégia das plantas para evitar-se a acumulação de nitrito e de amônio (FAURE et al., 1991) que, sob concentrações elevadas, podem ser extremamente prejudiciais ao metabolismo celular.

As principais fontes de  $\text{NH}_4^+$  para as plantas superiores residem na redução do  $\text{NO}_3^-$ , na absorção da solução do solo, na fixação simbiótica, na fotorrespiração e no catabolismo de alguns compostos nitrogenados, tais como asparagina e glutamato (SIVASANKAR & OAKS, 1996). Vale ressaltar que o processo fotorrespiratório, quando presente, é a principal fonte geradora de amônio, podendo superar em até 10 vezes a quantidade de  $\text{NH}_4^+$  originada pelo processo de redução do nitrato (GIVAN et al., 1988).

O  $\text{NH}_4^+$  produzido ou absorvido pela planta é assimilado em glutamina pela sintetase da glutamina (GS). Nas folhas, a GS tem duas isorformas:  $\text{GS}_1$ , que está presente no citossol e a  $\text{GS}_2$ , compartimentalizada nos cloroplastos (McNALLY et al., 1983). A  $\text{GS}_1$  está envolvida na síntese da glutamina para o transporte (EDWARDS et al., 1990), enquanto a  $\text{GS}_2$  tem como principal função assimilar o  $\text{NH}_4^+$  produzido durante a fotorrespiração (FREEMAN et al., 1990). A proporção das duas isoformas depende da espécie, da variedade e do tecido

vegetal (McNALLY et al., 1983; EDWARDS et al., 1990; FREEMAN et al., 1990 e PURCINO et al., 1998).

O efeito positivo do nitrogênio sobre a atividade da GS já foi observado em várias culturas, tais como feijão, ervilha e soja (HOELZLE et al., 1992). Em girassol, CABELLO et al. (1998) verificaram que a aplicação de  $\text{NO}_3^-$  induziu aumentos na atividade da  $\text{GS}_2$ , mas não da  $\text{GS}_1$ . Resultados com milho são divergentes, na medida em que WATANABE et al. (1985) observaram um aumento significativo na atividade da GS, em função da aplicação de nitrato, enquanto no trabalho de PURCINO et al. (1998) esse efeito positivo não foi observado para todas as cultivares. Em algumas situações, pode ser a luz, e não o nitrato, o principal responsável pelo estímulo ao aumento da síntese da GS (SEITH et al., 1994).

A GOGAT (aminotransferase da glutamina:2-oxoglutarato) catalisa a formação de duas moléculas de glutamato, a partir da glutamina gerada pela GS. Nas plantas cultivadas sem estresse a ação combinada da GS/GOGAT representa a forma primária de assimilação do amônio (LEA & MIFLIN, 1974). Dois tipos de GOGAT são conhecidos: GOGAT-Fd e a GOGAT-NAD(P)H (SIVASANKAR & OAKS, 1996). Nas folhas, a GOGAT-Fd, que se localiza nos cloroplastos, é a principal forma da enzima e pode representar até 1% do teor de proteína total (MÁRQUEZ et al., 1988). Além da folha, também é possível encontrar-se GOGAT-Fd em tecidos estiolados e em raízes (SUZUKI et al., 1982).

Em milho, a expressão do gene para a GOGAT-Fd e GOGAT-NADH foi aumentada em resposta à aplicação de  $\text{NO}_3^-$  (SAKAKIBARA et al., 1997). Quando plantas de cevada foram cultivadas continuamente com  $\text{NO}_3^-$ , o mRNA, os níveis da proteína e a atividade da GOGAT-Fd aumentaram consideravelmente (PAJUELO et al., 1997). Já em arroz, os níveis do mRNA da GOGAT-Fd foram aumentados pelo  $\text{NO}_3^-$ , mas o nível de acúmulo da proteína e a atividade não seguiram a mesma tendência (MATTANA et al., 1996). Em folhas de fumo, a diminuição na expressão dos genes da GOGAT-Fd, devido à deficiência de  $\text{NO}_3^-$ , foi considerada como conseqüência da redução que ocorreu

no metabolismo foliar e não como resultado de um efeito direto daquele nutriente (MIGGE & BECKER, 1996).

A desidrogenase do glutamato (GDH) é outra enzima do ciclo do nitrogênio que tanto pode sintetizar quanto oxidar o glutamato e apresenta duas isorformas: GDH-NADH, localizada na mitocôndria, e GDH-NADPH, no cloroplasto (SECHLEY et al., 1992). Antes da descoberta da via GS/GOGAT, a GDH foi considerada como a principal enzima envolvida na assimilação do amônio produzido ou absorvido pelas plantas. No entanto, FOX et al. (1995) concluíram que a principal função da GDH é oxidar o glutamato e gerar esqueletos de carbono para o funcionamento do ciclo dos ácidos tricarbônicos. Para aqueles autores, a importância dessa função residiria no fato de que, sob condições de deficiência de carbono, a GDH serviria como o elo de ligação entre o metabolismo do nitrogênio e do carbono. No entanto, a função real da GDH no metabolismo celular ainda não está bem definida (OAKS, 1995).

Vários genótipos de milho cultivados sob altos níveis de nitrato apresentaram atividades da GDH maiores do que quando cultivados sob deficiência desse íon (PURCINO et al., 1998). Em seringueira, a aplicação de  $\text{NO}_3^-$  promoveu aumentos significativos na atividade da GDH foliar, enquanto a atividade na raiz não sofreu qualquer alteração (DELÚ-FILHO, 1994). Por outro lado, foi verificado, em rabanete, que a aplicação do  $\text{NO}_3^-$  afetou negativamente a atividade da GDH (SOOD et al., 1999)

### **3 – O NITROGÊNIO E A ASSIMILAÇÃO DO CARBONO**

O aumento na disponibilidade do nitrogênio pode ter efeito positivo sobre a taxa de assimilação do carbono, já que ele é um elemento que faz parte dos principais componentes do sistema fotossintético, tais como clorofila, carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato (Rubisco) e carboxilase do fosfoenol piruvato (PEPcase), dentre outros. Três causas são enumeradas por KHAMIS et al. (1990) para explicar os efeitos da nutrição nitrogenada ( $\text{NO}_3^-$ ), sobre a fotossíntese: por alteração da quantidade, estrutura e composição do

aparelho fotossintético; competição entre a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  e o ciclo redutivo do carbono por poder redutor; e modulação do metabolismo do cloroplasto, em virtude da alteração que induz na composição dos carboidratos.

Quase sempre existe uma forte associação entre a taxa fotossintética e a concentração de nitrogênio foliar, independente se a relação for expressa com base na área ou na massa seca (EVANS, 1989). Os resultados com arroz indicam que a relação entre nitrogênio e a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  por unidade de área foliar é quase sempre linear, em função de que, nessas plantas, uma larga porção do nitrogênio foliar é investida na formação do aparelho fotossintético (MAE, 1997).

Em plantas de milho, cultivadas sob deficiência de nitrogênio, a redução na fotossíntese deveu-se à capacidade limitada do funcionamento do aparelho fotossintético, em virtude da redução nos níveis das proteínas dicinase do piruvato ortofosfato e carboxilase do fosfoenol piruvato (SUGIHARTO et al., 1990). Para alguns autores, o declínio da fotossíntese, sob deficiência de nitrogênio, é primariamente devido a uma redução da taxa de carboxilação e não a uma redução significativa nos parâmetros da fase fotoquímica (TAN & HOGAN, 1995). Em consonância com essa idéia, plantas de *Ulva rotundata*, cultivadas sob deficiência de nitrogênio, tiveram suas capacidades de assimilação de  $\text{CO}_2$  reduzidas, sem, no entanto, haver redução da eficiência fotoquímica (HENLEY et al., 1991). Além disso, a redução no ganho de carbono não foi associada com o efeito negativo da deficiência de nitrogênio sobre a eficiência do FSII (BUNGARD et al., 1997). Por outro lado, em café, a deficiência de nitrogênio reduziu o transporte de elétrons e a eficiência fotoquímica do FSII (NUNES et al., 1993). Conforme sugerido por LIMA et al. (1999), as divergências relacionadas ao efeito da deficiência do nitrogênio sobre os parâmetros fotoquímicos da fotossíntese estariam relacionadas à existência de diferentes mecanismos que propiciariam às plantas reciclar e, ou, alocar, de forma mais eficiente, o nitrogênio disponível.

O efeito do nitrogênio sobre o comportamento estomático é dependente da espécie e da etapa do ciclo da cultura. A deficiência de nitrogênio produziu

reduções na condutância estomática em feijão e pimentão (PEÑUELAS et al., 1993) e em algodão (RADIN & ACKERSON, 1981). GUIDI et al. (1998) também observaram que, em plantas de tomate cultivadas sob deficiência de nitrogênio, a redução da fotossíntese na fase vegetativa foi associada com a diminuição na condutância estomática; na fase reprodutiva, por sua vez, a condutância estomática não sofreu alterações. Resultado divergente foi encontrado em girassol, em que a deficiência de nitrogênio promoveu um aumento significativo na condutância estomática (CIOMPI et al., 1996).

A relação entre o teor de clorofila para uma dada quantidade de nitrogênio foliar varia, dependendo da irradiância e da temperatura, indicando que a quantidade de clorofila é um fator dinâmico e que responde à variação de alguns componentes do ambiente; nesse caso, a relação parece ser regulada para otimizar a captura da luz em relação ao potencial fotossintético do ambiente (MAE, 1997). Em milho, a imposição da deficiência de nitrogênio ocasionou maior redução na concentração de clorofila total do que na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, fazendo com que as plantas fossem mais eficientes em termos de assimilação de CO<sub>2</sub> por unidade de clorofila, do que plantas cultivadas sob suprimento adequado de nitrogênio (KHAMIS et al., 1990). Contudo, uma conclusão diferente foi postulada por LU & ZHANG (2000).

Os resultados que relacionam os efeitos da deficiência de nitrogênio sobre a razão clorofila *a/b*, que refletem a composição do tilacóide (ANDERSON et al., 1988), também têm sido divergentes. Em plantas de feijão, não se verificou nenhuma mudança naquela razão (LIMA et al., 1999), enquanto em milho foi possível evidenciar um aumento significativo na razão clorofila *a/b* (LICHTENTHALER & RINDERLE, 1988). Já em cevada, foi observado que a deficiência de nitrogênio pode aumentar (LICHTENTHALER & RINDERLE, 1988), ou mesmo não influir (HÁK et al., 1993) na relação clorofila *a/b*.

Apesar da forte correlação entre nitrogênio e fotossíntese, o efeito negativo da deficiência de nitrogênio sobre a fotossíntese, aparentemente, não seria a causa primária da redução no crescimento das plantas. Realmente, a menor disponibilidade de nitrogênio limita o crescimento, mas essa restrição

normalmente é mais pronunciada devido às menores taxas de formação e de expansão foliar do que a um declínio na taxa fotossintética (TOLLEY-HENRY & RAPER, 1986 a,b).

O nitrogênio também pode influenciar a alocação do carbono assimilado entre amido, sacarose e monossacarídeos, nas células do mesófilo. Quando a deficiência de nitrogênio reduz o crescimento, a utilização de assimilados pela planta é reduzida e maiores quantidades de carbono podem ser desviadas para a formação de amido (RUFTY et al., 1988). Para ROBINSON (1996), sob condições de deficiência de nitrogênio, a utilização de carbono para a síntese de proteínas pode ser reduzida, aumentando, dessa forma, a disponibilidade de substrato (hexoses) para a formação de amido. Se o acúmulo de amido no cloroplasto for excessivo, a fotossíntese pode ser seriamente afetada, em função de que o amido pode contribuir para a redução da condutância do mesófilo e dificultar o ingresso do CO<sub>2</sub> nos sítios de carboxilação (GUIDI et al., 1998).

O efeito da deficiência do nitrogênio sobre o acúmulo dos açúcares mais simples tem gerado alguns resultados divergentes. Em tomate, foi verificado um acúmulo de sacarose (GUIDI et al., 1998), enquanto WANG et. al. (1996) verificaram aumentos nos níveis de glicose e frutose, mas não nos de sacarose. Entretanto, em girassol, a concentração de nenhum dos três carboidratos citados foi alterada, mesmo após um período de 24 dias de crescimento em solução deficiente de nitrogênio (CIOMPI et al., 1996).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS**

Neste estudo, dois experimentos foram conduzidos, separadamente, em casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. A cv ‘Cigana Preta’ (*Manihot esculenta* Crantz, BGM 116) foi escolhida para a implantação dos experimentos. Essa variedade apresenta bom potencial produtivo, sendo indicada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura (CNPMPF/EMBRAPA) para plantios comerciais em algumas áreas da região Nordeste do Brasil.

O município de Viçosa (20°45’ S; 42°15’ W.) apresenta altitude média de 650 m, localizando-se na Zona da Mata do estado de Minas Gerais. O clima da região enquadra-se na classificação Cwb de Wilhelm Köppen.

O primeiro experimento foi implantado em 15 de dezembro de 1998 e encerrado em 15 de março de 1999; o segundo foi implantado em 20 de setembro de 2000 e encerrado em 20 de dezembro do mesmo ano. A radiação solar média, no interior da casa de vegetação, durante o período experimental, foi de 8,5 MJ m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup> e de 6,7 MJ m<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>, respectivamente, para o primeiro e segundo experimento.

#### **EXPERIMENTO Nº 1**

Manivas de aproximadamente 15 cm de comprimento foram retiradas das hastes do terço médio de plantas sadias e com idade aproximada de 11 meses.

Antes do plantio, as manivas foram tratadas com hipoclorito de sódio 5% (v/v) por 5 min., e, posteriormente, lavadas abundantemente com água de torneira.

O substrato utilizado para o plantio foi areia grossa, previamente lavada várias vezes com água de torneira e, por último, com água destilada, visando à retirada de toda matéria orgânica, de argilas e de minerais que, eventualmente, estivessem presentes.

A capacidade dos vasos utilizados foi de 10 kg de areia seca. As manivas foram plantadas na posição vertical, enterrando-se cerca de 50% do seu comprimento. Inicialmente, foram plantadas duas manivas em cada vaso. Nos primeiros 10 dias as plantas foram irrigadas, duas vezes ao dia, com água de torneira. Após esse período, foi descartada a planta menos vigorosa e o experimento passou a ser conduzido com apenas uma planta por vaso.

Em seguida ao desbaste, os vasos foram lavados abundantemente com água destilada e as plantas passaram, então, a ser fertilizadas com diferentes soluções nutritivas, modificadas a partir da solução de HOAGLAND & ARNON (1938). Essas soluções foram preparadas para apresentar quatro níveis de  $\text{NO}_3^-$  (0,5; 3,0; 6,0 e 12 mol  $\text{m}^{-3}$ ) (Tabela 1). Esses níveis foram escolhidos para que as plantas pudessem crescer com um intervalo de deficiência a bom suprimento de nitrogênio (TANKOU et al., 1990). O pH inicial de todas as soluções foi sempre ajustado para um valor entre 5,7 e 6,0.

As plantas receberam 3,4 L de solução (divididos em duas aplicações de 1,7 L). Como a capacidade de saturação do substrato era de 1,3 L, o excedente da primeira aplicação foi descartado. Após a segunda aplicação, o excedente foi recolhido e utilizado para as irrigações que se realizavam nos dias subseqüentes e sempre com 1,7 L de solução. A cada irrigação, o excedente era sempre recolhido. Quando a quantidade de solução recolhida como excedente era inferior a 1,7 L, completava-se a solução com água destilada, cujo pH também era ajustado, para situar-se na faixa de 5,7 a 6,0. Com essa operação, as plantas recebiam 3,0 L de solução nutritiva por semana. Nos primeiros 15 dias, as soluções nutritivas utilizadas para as irrigações apresentavam apenas a metade da força da solução definitiva.

Tabela 1. Concentração final dos macronutrientes ( $\text{mol m}^{-3}$ ) das soluções nutritivas de crescimento\*.

Tratamentos (soluções)	$\text{NO}_3^-$	P	K	Ca	Mg	S
1	0,5	1	6	3,5	1	6,75
2	3	1	6	3,5	1	5,5
3	6	1	6	3,5	1	4
4	12	1	6	3,5	1	1

\*Para a adição de micronutrientes, fez-se uma solução contendo: 2,86 g de  $\text{H}_2\text{BO}_3$  + 1,81 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  + 0,22 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 0,08 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 0,09 g de  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  em um litro. Foi usado 1 mL dessa solução por litro de cada solução de crescimento. Para a adição do ferro, foi preparada uma solução contendo 5,57g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 7,45 de EDTA em 1 litro. Posteriormente, utilizaram-se 3 mL dessa solução para cada litro da solução de crescimento.

A cada sete dias, todos os vasos eram lavados, primeiramente com 5,1 L de água de torneira e, depois, com 1,7 L de água destilada, a fim de evitar-se a salinização do substrato. Posteriormente a essa operação, eram aplicados, como mencionado, 3,4 L (1,7 L + 1,7 L) de solução nutritiva e o excedente utilizado nas irrigações dos dias subseqüentes.

A porção superior do vaso foi parcialmente coberta com papel laminado, para evitar-se proliferação de microrganismos e rápida evaporação de parte da solução aplicada.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro tratamentos (aplicações de  $\text{NO}_3^-$ ) e cinco repetições. Cada parcela experimental era constituída por uma planta.

Um dia antes do encerramento do experimento foram avaliadas as seguintes características:

TAXA FOTOSSINTÉTICA LÍQUIDA – Esse parâmetro foi determinado nos três últimos lóbulos centrais e totalmente expandidos, e em condições de casa de vegetação. As avaliações foram realizadas com um analisador de gás no infravermelho (IRGA), portátil, modelo LCA-2, em sistema aberto, com câmara foliar do tipo Parkinson (Analytical Development Company, Hoddesdon, UK) e fluxo de ar de  $300 \text{ mL min}^{-1}$ . Ao IRGA foi acoplada uma fonte artificial de luz para projetar, sobre a superfície da folha, uma irradiância de  $1100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . As medi\u00e7\u00f5es eram realizadas entre 9-11 horas. Para evitar-se que as varia\u00e7\u00f5es clim\u00e1ticas ocorridas ao longo do hor\u00e1rio de avalia\u00e7\u00e3o afetassem a tomada de dados, as avalia\u00e7\u00f5es foram realizadas por blocos. Durante o per\u00edodo de medi\u00e7\u00f5es a temperatura do ar oscilou entre 31 a  $33^{\circ}\text{C}$  e a umidade relativa entre 55 a 60%.

No dia do encerramento do experimento foram retiradas por\u00e7\u00f5es da lâmina foliar, para se determinar os seguintes par\u00e2metros:

F\u00d3SFORO INORG\u00c2NICO SOL\u00daVEL EM \u00c1CIDO – Foram coletados aproximadamente 500 mg do material foliar e imediatamente imersos em 3 mL de  $\text{HClO}_4$   $0,2 \text{ mol m}^{-3}$  frio e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, esse material foi macerado em almofariz com mais 3,0 mL do mesmo extrator e centrifugado a  $1.000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado ressuspensionado mais duas vezes com 3 mL de  $\text{HClO}_4$   $0,2 \text{ mol m}^{-3}$ . Ap\u00f3s esse processo, o volume do sobrenadante foi ajustado para 25 mL, filtrado e utilizado para a determina\u00e7\u00e3o de f\u00f3sforo, conforme LINDEMAN (1958).

FRA\u00c7\u00d5ES DE A\u00c7\u00daCAR E NITROG\u00caNIO – Amostras de 500 mg de mat\u00e9ria fresca foram imersas em 2 mL de etanol 80% fervente e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram maceradas em almofariz e centrifugadas a  $1.000 \times g$  por 10 min. O res\u00edduo foi ressuspensionado por mais tr\u00eas vezes em etanol 80% fervente. Ap\u00f3s a realiza\u00e7\u00e3o dessas opera\u00e7\u00f5es, o res\u00edduo foi armazenado e os sobrenadantes coletados, combinados e completado para 25 mL com etanol 80% frio. Desse extrato etan\u00f3lico, 10 mL foram despigmentados com clorof\u00f3rmio (10

mL) e água (3 mL) em funil de separação. Em seguida, o extrato despigmentado foi evaporado até a secura, em evaporador rotativo a vácuo, a 45 °C. O resíduo obtido foi ressuscitado em 5 mL de água destilada. Desse extrato final, tomaram-se alíquotas para a determinação de açúcares solúveis totais (HODGE & HOFREITER, 1962), açúcares redutores (NELSON, 1944),  $\text{NO}_3^-$  (CATALDO et al., 1975),  $\text{NH}_4^+$  livre (WEATHEBURN, 1967) e aminoácidos livres (MOORE & STEIN, 1948). A concentração de açúcares não-redutores foi estimada pela diferença entre as concentrações dos açúcares solúveis totais e de açúcares não-redutores. Para a determinação do amido, o resíduo da extração etanólica foi ressuscitado três vezes com ácido perclórico 30% e centrifugado a 1.000 x g por 10 min. Os sobrenadantes obtidos foram combinados e completados para 50 mL, obtendo-se uma solução com concentração final de ácido perclórico de 6,9%. A determinação do amido foi realizada com base na reação com antrona (HODGE & HOFREITER, 1962). Para a determinação dos açúcares e amido o padrão utilizado foi a glicose, enquanto para a determinação dos aminoácidos o padrão utilizado foi a glicina. Os carboidratos não-estruturais (CNE) foram estimados pela soma dos açúcares solúveis totais e amido

Para a determinação da relação matéria fresca/matéria seca, separou-se aproximadamente 1 g da lâmina foliar. Esse material foi seco a 75°C, por 96 h, em estufa com ventilação forçada de ar e, finalmente, pesado. Aproximadamente 0,1 g do material seco sofreu digestão sulfúrica e a concentração de nitrogênio total determinada colorimetricamente, utilizando-se o reagente de Nessler (UMBREIT et al., 1972).

PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS – 500 mg da amostra foliar foram imersos em nitrogênio líquido e imediatamente armazenados a -20°C para posterior análise. Antes do descongelamento, as amostras foram imersas em metanol:clorofórmio:água (MCA), na proporção de 12:5:3 (v/v/v), maceradas em almofariz e centrifugadas a 1.000 x g por 10 min. Essa operação foi repetida três vezes, sempre descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi, então, ressuscitado por três vezes com NaOH 0,1 mol m<sup>-3</sup> e, posteriormente,

centrifugado a 1.000 x g por 10 min. Os sobrenadantes combinados foram, então, utilizados para a quantificação das proteínas, conforme BRADFORD et al. (1976), utilizando-se da soroalbumina bovina (BSA) como padrão. O resíduo sofreu digestão sulfúrica e o nitrogênio insolúvel foi determinado colorimetricamente, utilizando-se do reagente de Nessler (UMBREIT et al., 1972). O nitrogênio solúvel foi calculado pela diferença entre o nitrogênio total e o nitrogênio insolúvel.

Antes da separação dos diferentes componentes da parte aérea (folha, pecíolo e caule) as plantas foram retiradas do substrato, as raízes de absorção lavadas com água de torneira e colocadas por 30 min em água destilada para permitir-se a difusão dos íons localizados no apoplasto. Após esse período, foram coletadas porções da parte mediana das raízes de absorção, para a determinação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  livre, aminoácidos, amido e proteínas, de forma semelhante ao que foi feito para o material foliar.

As raízes de armazenamento [diâmetro maior do que 0,5 cm; TANKOU et al. (1990)] foram destacadas, contadas e porções retiradas da parte central para a determinação de açúcares solúveis, açúcares redutores e amido.

Foram computados, ainda, os seguintes dados de crescimento: massa seca das folhas, do pecíolo, do caule, das raízes de absorção e das raízes de armazenamento.

## **EXPERIMENTO Nº 2**

Este experimento foi conduzido visando-se a avaliar o efeito do  $\text{NO}_3^-$  sobre as trocas gasosas das folhas, fluorescência da clorofila *a* e sobre algumas enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono e do nitrogênio. Em função dos resultados obtidos no primeiro experimento, escolheram-se apenas dois níveis de  $\text{NO}_3^-$ :  $3,0 \text{ mol m}^{-3}$ , que induziu uma deficiência moderada e  $12,0 \text{ mol m}^{-3}$ , considerado como sendo um suprimento adequado para o crescimento normal das plantas de mandioca. Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados, com seis repetições para as trocas gasosas e cinco repetições para a determinação

das atividades das enzimas. Cada parcela experimental era constituída por uma planta. A metodologia utilizada para promover o crescimento das plantas, neste experimento, foi igual à do experimento anterior.

Um dia antes do encerramento do experimento foram realizadas as seguintes avaliações:

**TROCAS GASOSAS** - Os procedimentos adotados para estimar-se a taxa de assimilação líquida do CO<sub>2</sub>, a condutância estomática ( $g_s$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e a concentração interna ( $C_i$ ) de CO<sub>2</sub> foram semelhantes ao do experimento anterior, quando se estimou a taxa fotossintética líquida, com a diferença que, neste experimento, foi utilizado apenas o lóbulo central da última folha totalmente expandida. Após a obtenção dos dados relativos à assimilação líquida de carbono procedeu-se à medição da respiração total, da seguinte forma: a luz artificial foi desligada e a câmara coberta com um tecido escuro, para evitar-se a incidência de qualquer luminosidade sobre a folha que estava sendo avaliada. Com o objetivo de se evitar o efeito da liberação de CO<sub>2</sub> “pós-iluminatório” esperou-se a estabilização das medições, que ocorreu com um tempo aproximado entre 6 - 8 min. Com os dados das trocas gasosas foi possível estimar-se a liberação do CO<sub>2</sub> pelo processo fotorrespiratório e a taxa de oxigenação e carboxilação da Rubisco, baseado no modelo proposto por SHARKEY (1988). Durante o período de medições a temperatura do ar oscilou entre 30 a 32°C e a umidade relativa entre 57 a 60%.

**FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a***- Na mesma folha que foi utilizada para a avaliação das trocas gasosas, avaliaram-se as alterações ocorridas na fase fotoquímica da fotossíntese. Os parâmetros foram rastreados com um medidor de fluorescência de luz modulada (FMS2, Hansatech, Norfolk, UK). Após um período de 30 min sob obscuridade, as folhas foram expostas à luz vermelha-distante de baixa intensidade ( $< 2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), computando-se, assim, os valores de fluorescência inicial ( $F_0$ ). Posteriormente, aplicou-se um pulso saturante de  $6.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  por 1 s para a redução máxima das quinonas A ( $Q_A$ ), obtendo-se, assim, os valores da fluorescência máxima ( $F_m$ ). Logo após, a luz actínica foi

acionada, numa intensidade de  $1.100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para a obtenção da fluorescência constante ( $F_s$ ). Após 480 s, um pulso adicional saturante de  $6.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi aplicado por 1 s, medindo-se, em seguida, a fluorescência máxima adaptada à luz ( $F_m$ ). A luz actínica foi, então, desligada e a luz vermelha-distante novamente ligada para a medição da fluorescência inicial adaptada à luz ( $F_0'$ ). As seguintes estimativas foram obtidas: razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima ( $F_v/F_m$ ), a eficiência fotoquímica dos FSII abertos ( $F_v/F_m'$ ), a dissipação da energia fotoquímica [coeficiente de energia fotoquímica (qP)], a dissipação da energia não-fotoquímica [coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ)] e taxa de transporte de elétrons (ETR), conforme GENTY et al. (1989). A fração da luz absorvida que foi dissipada (D) ou usada na fotoquímica do FSII (P) foram calculadas, respectivamente, como  $[(1-(F_v/F_m'))]$  e  $(F_v/F_m') \times \text{qP}$  (DEMMING-ADAMS et al., 1996). O nível de redução de  $Q_A$  foi determinado pela expressão  $(1-\text{qP})$ , conforme MAXWELL & JOHNSON (2000). A nomenclatura dos parâmetros da fluorescência seguiu as recomendações descritas por van KOOTEN & SNEL (1990) e MAXWELL & JOHNSON (2000).

**CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA** – Dos mesmos lóbulos utilizados para a avaliação das trocas gasosas, foram retirados dois discos foliares (totalizando  $1,327 \text{ cm}^2$ ) e utilizados para a determinação da clorofila. Os discos foram imersos em 7 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e incubados a  $60^\circ\text{C}$  por 20 min, no escuro (HISCOX & ISRAELSTAM, 1979). Após o resfriamento, à temperatura ambiente e ainda no escuro, foram adicionados mais 3 mL de DMSO para perfazer um volume final de 10 mL. As absorbâncias dos extratos foram lidas a 648 e 665 nm, utilizando-se como branco o DMSO. Quando necessário, as amostras foram diluídas com DMSO para obtenção de leituras com valores entre 0,15 e 0,8 de absorbância. O conteúdo das clorofilas *a*, *b* e total foi calculado usando-se da equação de BARNES et al. (1992).

Após a realização das avaliações supracitadas, a folha foi destacada da planta, a área foliar medida, sem as nervuras, e colocadas para secar a  $75^\circ\text{C}$  em

estufa de circulação forçada de ar. Após 96 h, computou-se a massa seca dessa folha. Posteriormente, foram tomados 100 mg de tecido vegetal seco para a análise de nitrogênio total. Com esses dados foi possível calcular a área foliar específica (AFE) e a eficiência no uso do nitrogênio para a fotossíntese ( $E_N$ ).

#### ATIVIDADE DAS ENZIMAS:

Três outros grupos de 10 plantas foram utilizados, 90 dias após o plantio, para a determinação da atividade das seguintes enzimas:

#### REDUTASE DO NITRATO (RN; EC 1.6.6.1)

O ensaio da atividade dessa enzima foi realizado *in vivo*, 24 e 48 h após a última renovação das soluções. Tomaram-se, aproximadamente, 300 mg de discos foliares de 5 mm<sup>2</sup>, sem a nervura central e dos lóbulos da última folha totalmente expandida. Os discos foram colocados em 'ermeyer' de 25 mL, contendo 10 mL de um meio de incubação, formado por tampão fosfato de potássio (100 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,5), KNO<sub>3</sub> (100 mol m<sup>-3</sup>) e n-propanol 2% (v/v). Todo esse conjunto foi infiltrado a vácuo por três vezes, durante 1 min, a uma pressão de 86,8 kPa. Logo após, foram incubados a 30°C, em total obscuridade. Aos 20 e 40 min, foram retiradas alíquotas de 500 µL e, então, adicionadas a um meio de reação contendo 1 mL de sulfanilamida 1% (p/v) em HCl 1,5 mol m<sup>-3</sup>, 1 mL de N-1-naftil etilenodiamino bicloridrato di-HCl 0,02% (p/v) e 1,5 mL de água destilada. Após 30 min, a quantificação do nitrito formado foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

#### OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DEMAIS ENZIMAS:

Várias amostras de 1 g da última folha totalmente expandida, sem a nervura central, foram coletadas entre 9:30-11:00 h, imediatamente colocadas em papel-alumínio e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, esse material foi armazenado em freezer, a -80°C. Os extratos brutos foram obtidos pela maceração das amostras em 5 mL de um meio, que variou em função da enzima

a ser ensaiada (DELÚ-FILHO, 1994). As extrações foram realizadas em banho-de-gelo e no interior de uma câmara fria (temperatura em torno de 5°C). Todos os materiais de extração e soluções utilizados sofreram uma pré-refrigeração. Estes procedimentos permitiram que todo o processo de extração das enzimas fosse realizado entre 0 e 4°C.

#### EXTRAÇÃO E ENSAIO DA SINTETASE DA GLUTAMINA (GS; EC 6.3.1.2) E DESIDROGENASE DO GLUTAMATO DEPENDENTE DE NADH (GDH-NADH; EC 1.4.1.2).

O meio de extração foi constituído de: tampão HEPES (50 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,5), 2-mercaptoetanol (10 mol m<sup>-3</sup>), PVPP (2%), PVP (1%), EDTA (1 mol m<sup>-3</sup>) e MgCl<sub>2</sub> (5 mol m<sup>-3</sup>). A centrifugação foi realizada a 18.000 x g, por 20 min, a 2-4°C. O extrato foi usado até, no máximo, 2 h da extração.

Para o ensaio da GS, 320 µL dos extratos foram adicionados a um meio contendo tampão Tris-HCl (100 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,5), 2-mercaptoetanol (10 mol m<sup>-3</sup>), MgSO<sub>4</sub> (40 mol m<sup>-3</sup>), glutamato (50 mol m<sup>-3</sup>), hidroxilamina (10 mol m<sup>-3</sup>), ATP (10 mol m<sup>-3</sup>), em um volume final de 1000 µL (DELÚ FILHO, 1994). Essa mistura foi incubada, por 20 min, a 30°C. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma solução contendo: cloreto férrico (0,37 mol m<sup>-3</sup>), HCl (0,67 mol m<sup>-3</sup>) e ácido tricloroacético (0,2 mol m<sup>-3</sup>). Para a avaliação do branco, a solução responsável pela paralisação da reação foi adicionada antes da adição do extrato. As proteínas foram removidas por centrifugação a 1.000 x g, por 5 min, e o quelato Fe-L-glutamil-γ-hidroxiato produzido foi determinado espectrofotometricamente, a 540 nm (RATAJCZAK et al., 1981). Uma curva de calibração com γ-glutamilhidroxiato de até 4 µmol, foi utilizada como padrão.

Para o ensaio da GDH-NADH, usou-se o método descrito por DELÚ FILHO (1994), com a introdução de algumas modificações. Tomaram-se alíquotas de 25 e 50 µL de extratos dos tratamentos 3 e 12 mol m<sup>-3</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente, que foram adicionadas a um meio contendo: tampão tris-HCl (100 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,5), sulfato de amônio (100 mol m<sup>-3</sup>), 2-oxoglutarato (10 mol m<sup>-3</sup>), cloreto de cálcio (4 mol m<sup>-3</sup>), em um volume de 2,7 mL. Esse meio foi

incubado em banho-maria a 30°C, por 3 min e, em seqüência, adicionou-se 0,3 mL de NADH (0,1 mol m<sup>-3</sup>), perfazendo um volume final de 3 mL. A oxidação do NADH foi rastreada, automaticamente, a cada 60 s, durante 600 s, em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-2000, Japão), a 340 nm. Para a formação do branco, omitiu-se o 2-oxoglutarato do meio de reação.

#### EXTRAÇÃO E ENSAIO DA SINTASE DO GLUTAMATO DEPENDENTE DE FERREDOXINA (GOGAT-Fd; EC 1.4.7.1)

O material vegetal foi macerado em almofariz, cujo meio foi constituído de: tampão fosfato de potássio (100 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,5), 2-mercaptoetanol (10 mol m<sup>-3</sup>), PVPP (2%), PVP (1%), EDTA (1 mol m<sup>-3</sup>) e MgCl<sub>2</sub> (5 mol m<sup>-3</sup>). A centrifugação foi realizada a 18.000 x g, por 20 min, a 2-4°C. O extrato foi utilizado até, no máximo, 2 h da extração.

Ensaiou-se a enzima conforme MATOH et al. (1979), com modificações. Aliquotas de 300 µL foram adicionadas a um meio de reação contendo: tampão fosfato de potássio (133 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,5), glutamina (10 mol m<sup>-3</sup>), 2-oxoglutarato (10 mol m<sup>-3</sup>) e metil viologênio (8 mol m<sup>-3</sup>). Para o branco, omitiram-se o 2-oxoglutarato e a glutamina do meio de reação. Essas misturas foram incubadas por 2 min, a 30°C, e a reação iniciada pela adição de 300 µL do reagente redutor (constituído de 16 mg de ditionito de sódio/mL + 16mg de bicarbonato de sódio/mL). O volume final foi de 1,5 mL. Após 20 min, a reação foi paralisada, por imersão dos tubos em água fervente, por 2 min, seguida de uma agitação imediata e vigorosa, para o desaparecimento da cor azul. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho-de-gelo e, finalmente, centrifugados a 20.000 x g, por 5 min. O glutamato formado na reação foi separado da glutamina, passando-se 1 mL do sobrenadante em uma coluna de DOWEX 1 X 8 (100-200 mesh) na forma acética. Após a lavagem com 15 mL de água destilada, o glutamato retido foi eluído com uma solução de ácido acético (0,3 mol m<sup>-3</sup>). Após recolher-se 7,0 mL, tomou-se uma alíquota de 1 mL que foi misturada a 2 mL de uma solução formada por: 400 mg de ninhidrina, 1g de CdCl<sub>2</sub>, 80 mL de etanol, 10 mL de ácido acético e 20 mL de água. Após

incubação em banho-maria a 80°C, por 10 min, a reação foi paralisada por imergir os tubos em banho-de-gelo. A absorbância foi lida a 506 nm e comparada com uma curva padrão de glutamato, de até 300 nmol.

EXTRAÇÃO E ENSAIO DAS INVERTASES (EC 3.2.1.26) ÁCIDA E NEUTRA E SINTASE DA SACAROSE (EC 2.4.1.13) – O material vegetal foi macerado em almofariz, cujo meio de extração foi constituído por: tampão Hepes (50 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,0), 2-mercaptoetanol (10 mol m<sup>-3</sup>), PVPP (2%), PVP (1%), EDTA (1,0 mol m<sup>-3</sup>) e MgCl<sub>2</sub> (10 mol m<sup>-3</sup>). A centrifugação foi realizada a 18.000 x g, por 20 min, a 2-4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota de 0,5 mL foi dessalinizada através de uma coluna de 3 mL de Sephadex G-25. O mesmo extrato foi utilizado para o ensaio das três enzimas.

A atividade da invertase ácida foi ensaiada da seguinte forma: uma alíquota de 50 µL do extrato dessalinizado foi incubada com 950 µL de uma solução contendo tampão acetato de sódio (125 mol m<sup>-3</sup>; pH 4,5), sacarose (50 mol m<sup>-3</sup>) e MgCl<sub>2</sub> (15 mol m<sup>-3</sup>). A reação foi iniciada pela adição do extrato e a mistura incubada a 28°C, por 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL do reagente de cobre alcalino (NELSON, 1944). O meio de reação foi centrifugado a 1.000 x g, por 5 min, e a atividade da enzima determinada, avaliando-se a produção de açúcares redutores (NELSON, 1944). Para a formação do branco omitiu-se a sacarose do meio de reação.

A atividade da invertase neutra foi avaliada de forma semelhante ao da invertase ácida, à exceção do tampão acetato que foi substituído por tampão fosfato (125 mol m<sup>-3</sup>; pH 7,5).

A atividade da sintase da sacarose, na direção da hidrólise, foi ensaiada com 100 µL do extrato dessalinizado, em um meio contendo: tampão Hepes-NaOH (125 mol m<sup>-3</sup>; pH 6,5), sacarose (125 mol m<sup>-3</sup>), MgCl<sub>2</sub> (15 mol m<sup>-3</sup>) e UDP (uridina-5-difosfato, 2 mol m<sup>-3</sup>), em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição do extrato, incubada a 28°C, por 15 min, e paralisada pela adição do reagente de cobre alcalino (NELSON, 1944). O meio de reação foi centrifugado a 1.000 x g, por 5 min, antes da quantificação dos açúcares

redutores (NELSON, 1944). Para a formação do branco, omitiu-se a UDP do meio de reação.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA:

As análises estatísticas foram efetuadas mediante ajustes das equações e testes de correlação (experimento 1). As equações de regressão foram ajustadas entre as variáveis dependentes, em função da variável independente (doses de  $\text{NO}_3^-$ ). Com base no quadrado médio dos resíduos das análises de variância, testou-se a significância dos modelos das equações de regressão. Optou-se pelo modelo que apresentou maior coeficiente de determinação, maior significância e que fosse explicável do ponto de vista biológico. Para avaliar-se as inter-relações entre algumas variáveis de interesse, efetuou-se estudo de correlação, baseado no modelo de Pearson.

Os dados do experimento 2 foram submetidos a uma análise de variância; quando os valores de F foram significativos, fez-se uma comparação das médias. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se do programa de análise estatística SAEG, da Universidade Federal de Viçosa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.0 - EFEITO DO NITRATO SOBRE O METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MANDIOCA

A massa seca (total e parte aérea) aumentou com o incremento das doses de  $\text{NO}_3^-$  aplicadas, tendendo a estabilizar-se em torno de  $9 \text{ mol m}^{-3}$ , ao passo que nenhum ganho adicional da massa seca de raízes tuberosas foi observado além da aplicação de  $6 \text{ mol m}^{-3}$  (Figura 1). Para as raízes de absorção, seu acúmulo de massa seca foi linear e positivo com o aumento das doses de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 1).

A concentração do nitrogênio total, tanto da folha (Figura 2A) quanto da raiz (Figura 2B), aumentou, linear e significativamente, em função da elevação dos níveis de  $\text{NO}_3^-$ . A concentração do nitrogênio foliar variou de 27,2 a 43,6  $\text{mg g}^{-1}$  (MS), respectivamente, para os níveis de 0,5 e 12,0  $\text{mol m}^{-3}$ . Nas raízes de absorção a concentração de nitrogênio total variou de 8,6 a 16,0  $\text{mg g}^{-1}$ (MS). Considerando que a produção de massa seca total tendeu a estabilizar-se a partir da aplicação de  $9,0 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 1), enquanto a concentração de nitrogênio foi sempre linear (Figuras 2A, 2B), existe a possibilidade de que as plantas podem ter absorvido íons  $\text{NO}_3^-$  além da sua capacidade de utilização no processo de crescimento.

A relação entre as doses de  $\text{NO}_3^-$  aplicadas e a concentração desse íon na folha foi quadrática (2C), sem, no entanto, ter sido detectado nenhum nível de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas das plantas submetidas a baixos teores de  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva.

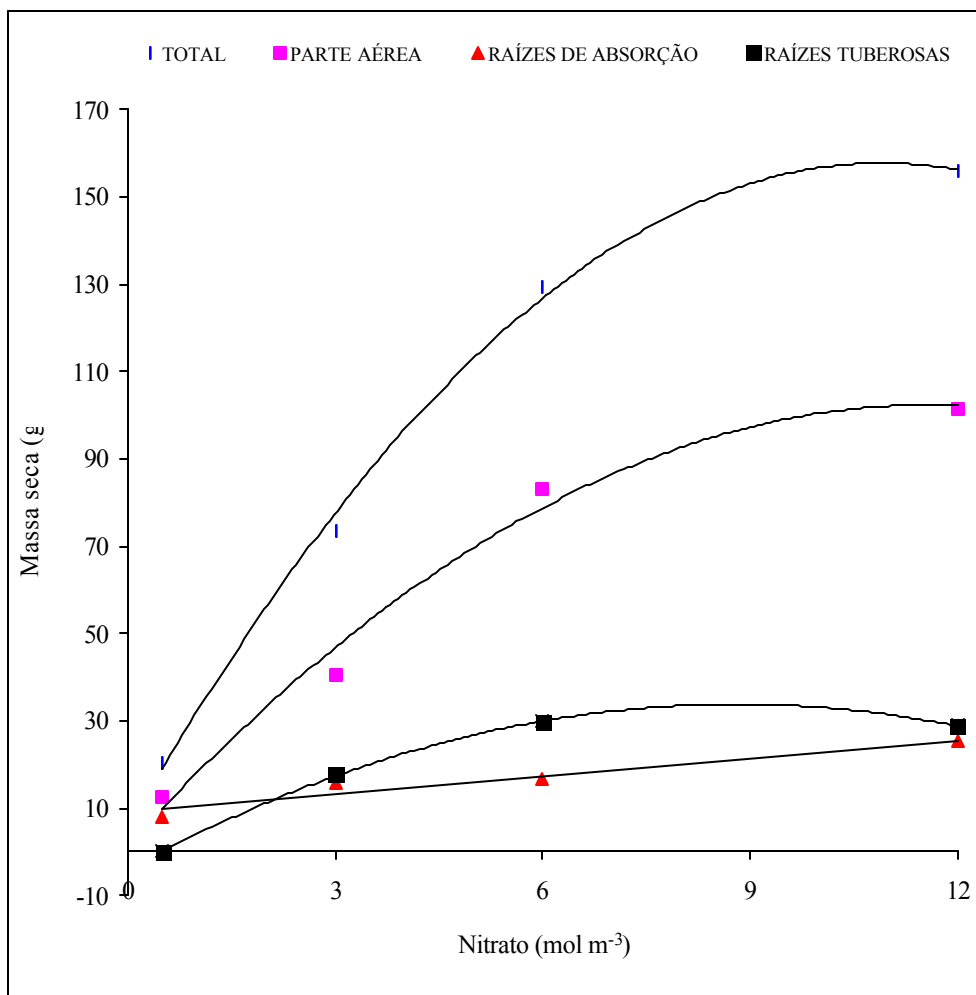
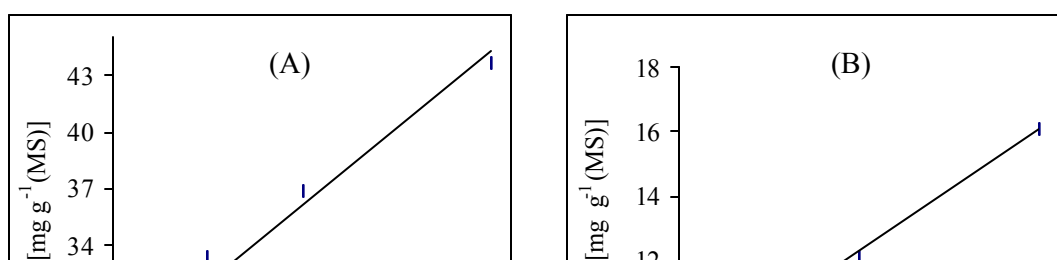


Figura 1 - Efeito da concentração do nitrato sobre a massa seca das plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. Símbolos representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: total ( $y = -1,28x^2 + 27,95x + 5,20$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ); parte aérea ( $y = -0,75x^2 + 17,42x + 1,24$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ); raízes de absorção ( $y = 1,38x + 9,09$ ;  $R^2 = 0,94^{**}$ ) e raízes tuberosas ( $y = -0,49x^2 + 8,59x - 4,06$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ).  $^{**}$  - significativo a  $p < 0,01$ .



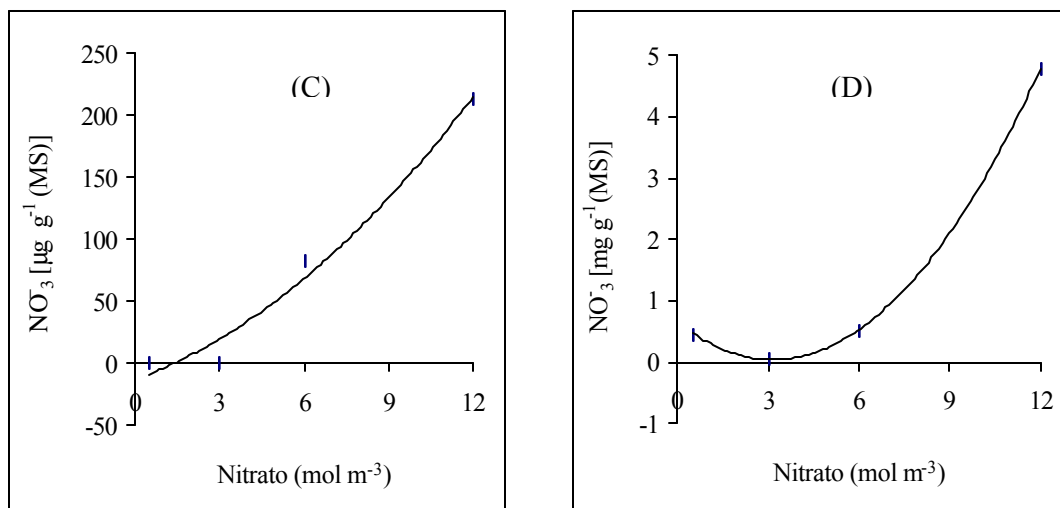


Figura 2 - Efeito da concentração do nitrato sobre os níveis de nitrogênio total das folhas (A) e das raízes de absorção (B) e  $\text{NO}_3^-$  das folhas (C) e das raízes de absorção (D) de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. (Observar diferenças de escala). Símbolos representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: A – ( $y = 1,36x + 27,90$ ;  $R^2 = 0,96^{**}$ ); B – ( $y = 0,63x + 8,50$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ); C – ( $y = 0,90x^2 + 8,25x - 12,88$ ;  $R^2 = 0,98^{**}$ ); D – ( $y = 0,061x^2 - 0,38x + 0,64$ ;  $R^2 = 1^{**}$ ).  $^{**}$  significativo a  $p < 0,01$ .

Mesmo para as plantas cultivadas com suprimento adequado de  $\text{NO}_3^-$ , a concentração desse íon no tecido foliar foi baixa. Em termos comparativos, as plantas supridas com  $12 \text{ mol m}^{-3}$  apresentaram menores concentrações de  $\text{NO}_3^-$  foliar do que plantas de cevada cultivadas com  $2,0 \text{ mol m}^{-3}$  desse íon (LEWIS et al., 1982).

A relação entre as doses aplicadas de  $\text{NO}_3^-$  e a sua concentração nas raízes de absorção foi quadrática, com o maior valor sendo obtido pelas plantas cultivadas sob  $12 \text{ mol m}^{-3}$  (Figura 2D). A concentração de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes de absorção das plantas cultivadas com  $0,5 \text{ mol m}^{-3}$  foi maior do que a das plantas cultivadas com  $3,0 \text{ mol m}^{-3}$  e semelhante à das plantas do tratamento com  $6,0 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$  (2D). Conforme sugerido por RUFTY et al. (1990), a maior concentração de  $\text{NO}_3^-$  encontrada nas raízes das plantas cultivadas com  $0,5 \text{ mol m}^{-3}$  pode ter sido consequência do aumento no potencial de absorção desse íon, devido ao aumento na taxa de crescimento das raízes e na eficiência de absorção dessas plantas. Além disso, TALOUIZTE et al. (1984a) também verificaram que, sob condições de deficiência de  $\text{NO}_3^-$ , a maior parte do  $\text{NO}_3^-$  absorvido é retida nas raízes.

Em todos os tratamentos, a concentração de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes de absorção foi sempre maior do que a das folhas. BARNEIX et al. (1984), no entanto, verificaram que, em cevada, o  $\text{NO}_3^-$  é a principal forma de armazenamento de nitrogênio [até  $1.800 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}(\text{MS})$ ] e seu acúmulo ocorre, prioritariamente, nas folhas e não nas raízes. Neste experimento, a baixa concentração foliar de  $\text{NO}_3^-$  pode ter sido consequência da capacidade reduzida de seu transporte das raízes para a parte aérea, à semelhança do que tem sido verificado em soja por RADIN et al. (1978). Isso porque, em mandioca as folhas são os sítios preferenciais de redução do  $\text{NO}_3^-$  e a atividade da RN é relativamente baixa (PEREIRA & SPLITTSTOESSER, 1986)

Em plantios comerciais de mandioca é comum haver perda de parte da folhagem acarretada por estresse hídrico, por ataque de pragas (ex. mandarová) ou por cortes sucessivos realizados pelos produtores, com o objetivo de fornecer alimentação aos animais na época seca. Assim, o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$ , nas raízes,

pode ser de grande importância, porque os íons aí acumulados podem suprir a parte aérea com nitrogênio, permitindo, dessa forma, o rápido crescimento das plantas após a perda da folhagem ou, então, quando as condições ambientes voltarem a ser adequadas.

A concentração de  $\text{NH}_4^+$  no tecido foliar aumentou linearmente com o incremento das doses de  $\text{NO}_3^-$  aplicadas (Figura 3A). Como as plantas não foram fertilizadas com  $\text{NH}_4^+$ , é possível sugerir que a maior concentração desse íon, nas plantas cultivadas sem déficit, foi decorrente do aumento que a fertilização nítrica provocou nos processos de fotorrespiração (Tabela 7) e de redução do  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 2). Já a concentração de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes apresentou uma relação quadrática, com as plantas cultivadas com  $0,5 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$  tendo o maior valor (Figura 3B). Este resultado sugere que, além de ser retido, o  $\text{NO}_3^-$  pode passar a ser reduzido nas raízes das plantas cultivadas sob déficit severo de  $\text{NO}_3^-$ , conforme observado por RUFTY et al. (1990). Adicionalmente, a maior concentração de  $\text{NH}_4^+$  radicular também pode ter sido consequência do aumento da atividade oxidativa da GDH, conforme alguns resultados apresentados por SRIVASTAVA & SINGH (1987).

Nas folhas, o teor de nitrogênio reduzido (nitrogênio total menos  $\text{NO}_3^-$ ) e de nitrogênio insolúvel, mas não o de nitrogênio solúvel, apresentaram uma relação linear e positiva com os níveis aplicados de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3C). A fração do nitrogênio total que se manteve como nitrogênio solúvel também seguiu ajuste linear; porém, os maiores valores foram obtidos nas doses mais baixas de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3D). A observação de que as folhas de mandioca particionam de 55 a 65% do nitrogênio total para a fração solúvel, claramente contrasta com plantas de sorgo, que particionam em torno de 23% daquela fração (GOMES, 1983 e GARDNER et al., 1994), e de fumo (RUFTY et al., 1990) e estilosantes (MOSQUIM, 1978), cujos particionamentos se situam ao redor de 6%.

Nas folhas, o teor de proteínas solúveis seguiu uma relação quadrática e positiva (Figura 4A), com a estabilização dos valores ocorrendo a partir de  $6,0 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$ . O teor de proteínas solúveis das raízes de absorção aumentou linearmente com a elevação das concentrações de  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva

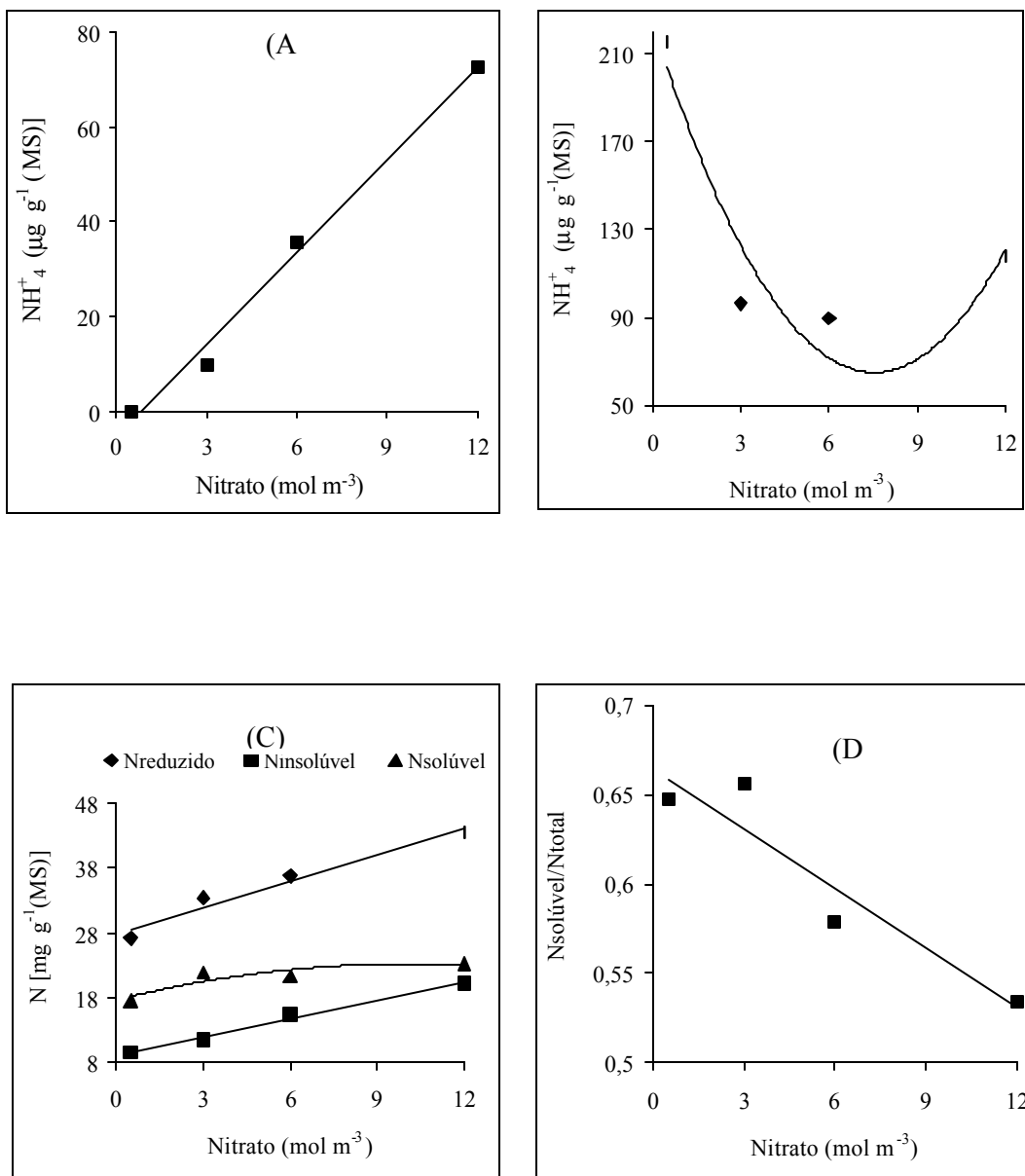


Figura 3 - Efeito da concentração do nitrato sobre os níveis  $\text{NH}_4^+$  das folhas (A) e das raízes de absorção (B), frações do nitrogênio foliar (C) e razão entre nitrogênio solúvel e nitrogênio total das folhas (D) de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. (Observar diferenças de escala). Símbolos representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: A - ( $y = 6,50x - 5,44$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ); B - ( $y = 2,82x^2 - 42,38x + 224,65$ ;  $R^2 = 0,89^{**}$ ); C - [N reduzido ( $y = 1,34x + 27,99$ ;  $R^2 = 0,96^{**}$ ; (N solúvel ( $y = 1,34x + 27,99$ ;  $R^2 = 0,96^{**}$ ); (N total ( $y = 1,34x + 27,99$ ;  $R^2 = 0,96^{**}$ )).

=  $-0,055x^2 + 1,10x + 17,66$ ;  $R^2 = 0,80$  <sup>NS</sup>; N insolúvel ( $y = 0,95x + 9,10$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ); D - ( $y = - 0,01x + 0,66$ ;  $R^2 = 0,89^*$ ). \*, \*\* - significativos a  $p < 0,05$  e  $0,01$ ; respectivamente; <sup>NS</sup> = não significativo.

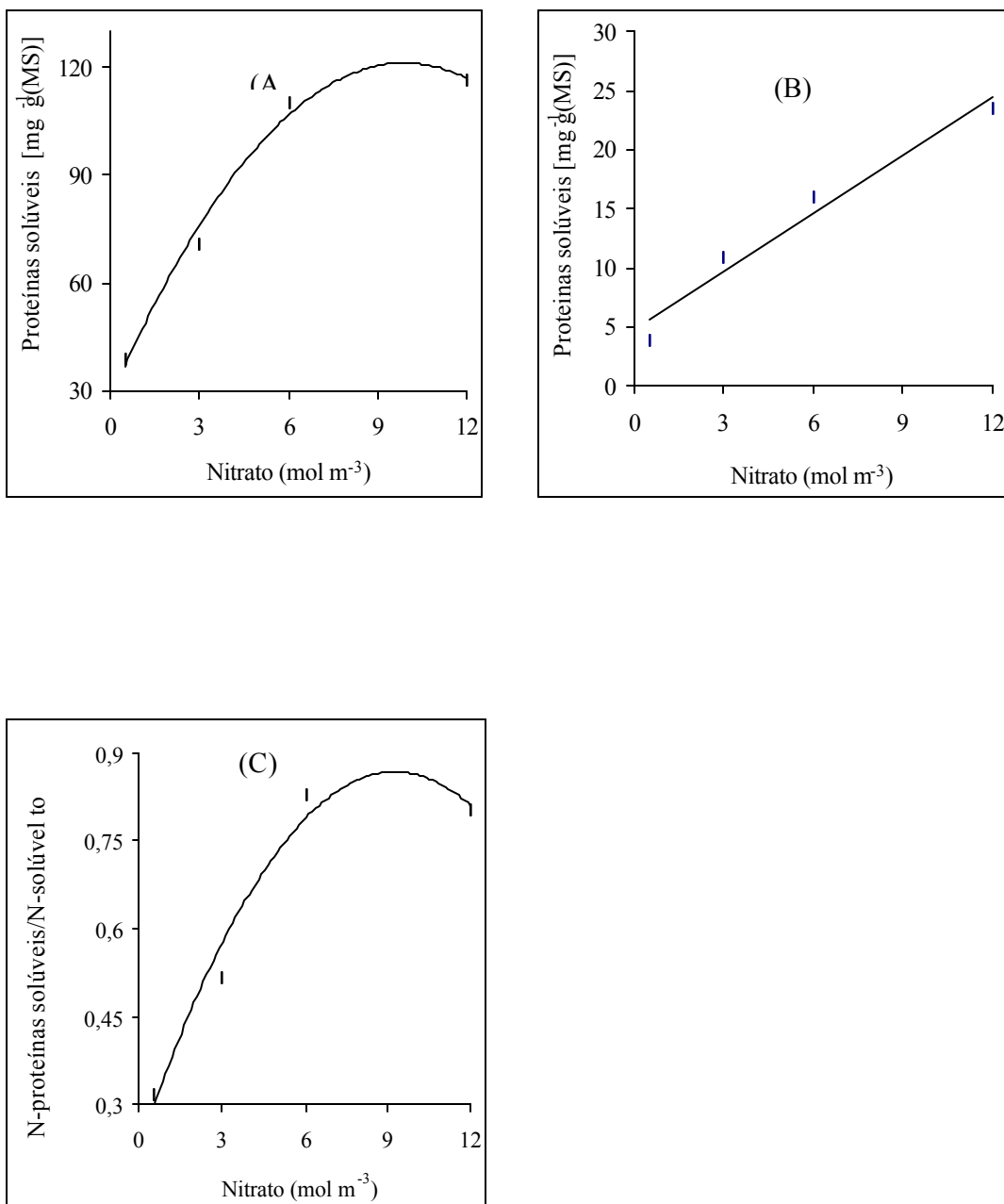


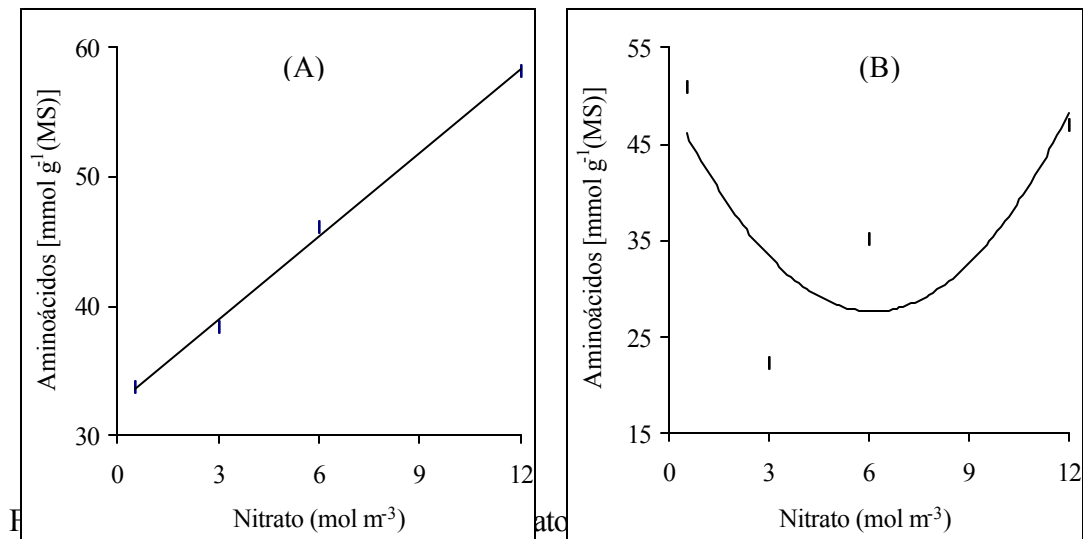
Figura 4 - Efeito da concentração do nitrato sobre os teores de proteínas solúveis das folhas (A) e das raízes (B) e razão entre N-proteico solúvel/Nsolúvel total das folhas (C) de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. (Observar diferenças de escala). Símbolos representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: A - ( $y$

=  $-0,96x^2 + 18,97x + 27,57$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ); B - ( $y = 1,64x + 4,77$ ;  $R^2 = 0,96$ ); C - ( $y = -0,0075x^2 + 0,14x + 0,23$ ;  $R^2 = 0,97$ ).  $^{**}$  - significativo a  $p < 0,01$ .

(Figura 4B). Embora a concentração de nitrogênio solúvel não tenha sido influenciada pelos níveis de  $\text{NO}_3^-$ , é possível verificar que a porcentagem do nitrogênio solúvel direcionada para a formação das proteínas solúveis foi bastante alta para as plantas cultivadas sob boa disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$ , em torno de 80%, enquanto para as folhas das plantas cultivadas com 3,0 e 0,5  $\text{mol m}^{-3}$  esse valor foi de 51% e 42%, respectivamente (Figura 4C). Uma possibilidade para a menor formação de proteínas, nos tecidos das plantas cultivadas sob 0,5 e 3,0  $\text{mol m}^{-3}$ , é que a presença de níveis adequados de  $\text{NO}_3^-$  seriam necessários para a expressão de muitos genes que codificam diversas proteínas (REDINBAUGH & CAMPBELL, 1991). Uma outra possibilidade pode ter sido o aumento no nível de proteases dessas plantas, conforme sugerido por (GALANGAU et al., 1988), que atuam no sentido de diminuir a concentração de proteínas solúveis do tecido vegetal.

A capacidade de manter a maior parte do nitrogênio na forma solúvel e direcioná-lo para a formação de proteínas solúveis pode ajudar a entender, ao menos parcialmente, porque plantas de mandioca apresentam algumas vantagens, principalmente em termos de assimilação de  $\text{CO}_2$ , quando comparadas a outras plantas do mesmo grupo  $\text{C}_3$  (EL-SHARKAWY, 1992).

Os teores foliares de aminoácidos livres aumentaram linearmente em função do aumento nos níveis de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 5A). Esse incremento, possivelmente, deveu-se ao aumento da atividade das enzimas responsáveis pela assimilação e reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  (Tabela 2). A relação entre os teores radiculares de aminoácidos e a concentração de nitrato na solução nutritiva foi quadrática, sendo possível observar que o valor obtido pelas plantas cultivadas sob 0,5  $\text{mol m}^{-3}$  foi semelhante ao observado para as plantas cultivadas sob 12  $\text{mol m}^{-3}$  (Figura 5B). Essa alta concentração de aminoácidos nas raízes das plantas cultivadas com 0,5  $\text{mol m}^{-3}$  pode ter sido consequência de (i) inibição na formação das proteínas; (ii) aumento no processo de degradação das proteínas; (iii) aumento na capacidade de assimilação do  $\text{NH}_4^+$ ; e (iv) maior importação de aminoácidos da parte aérea (RUFTY et al., 1990).



folhas (A) e das raízes de absorção (B) de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. (Observar diferenças de escala). Símbolos representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: A - ( $y = 2,15x + 32,56$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ); B - ( $y = 0,59x^2 - 7,19x + 49,60$ ;  $R^2 = 0,59^*$ );  $^{**}$  e  $^*$  - significativo a  $p < 0,01$  e  $0,05$ , respectivamente.

A atividade foliar da RN foi maior no segundo dia subsequente à renovação da solução nutritiva (Tabela 2). Este resultado evidencia que, após a fertilização com nitrato, haveria a necessidade de um período de espera, superior a 24 h, para que se possa amostrar o tecido foliar de mandioca para a análise da RN. DODDEMA et al. (1986) também obtiveram resultados mostrando que, em tomate, um período superior a 24 h foi necessário para que a aplicação do  $\text{NO}_3^-$  pudesse induzir máxima atividade da RN. No entanto, PURCINO et al. (1998) observaram, em milho, que a atividade máxima da RN foi obtida 24 h após a aplicação do  $\text{NO}_3^-$  no meio de cultivo. Provavelmente, os processos de absorção, carregamento no xilema e, ou, transporte do  $\text{NO}_3^-$  para a parte aérea, sejam mais lentos em mandioca do que em milho.

Nas plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$ , o aumento na atividade da RN, em torno de 270%, de 24 para 48 h, foi muito maior do que para as plantas cultivadas sem deficiência, cujo aumento foi de, aproximadamente, 83% (Tabela 2). No entanto, nos dois dias de avaliação as plantas cultivadas sob o nível mais alto de  $\text{NO}_3^-$  apresentaram a maior atividade da RN. Esse efeito positivo do  $\text{NO}_3^-$  sobre a atividade da RN também foi encontrado em braquiária (FERNANDES et al., 1976) e em seringueira (DELÚ-FILHO, 1994). Para CRAWFORD et al. (1992), o  $\text{NO}_3^-$  pode ser considerado como o sinal primário para a indução da atividade da RN, visto que ele, além de propiciar aumentos nos níveis do mRNA da proteína, também estimularia a sua atividade. Adicionalmente, o  $\text{NO}_3^-$  também pode colaborar para a redução da atividade de proteases e prevenir a degradação da RN (GALANGAU et al., 1988).

A atividade da RN, de  $1,5 \mu\text{mol} (\text{NO}_2) \text{ g}^{-1}(\text{MF}) \text{ h}^{-1}$ , obtida com a aplicação de  $12 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$ , foi semelhante à obtida em outro trabalho com mandioca (PEREIRA & SPLITTSTOESSER, 1986), mas é inferior às encontradas para plantas de tomate (cultivadas com  $4,5 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$ ) e espinafre (cultivadas com  $14,0 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$ ), que apresentaram, respectivamente, atividades de  $60$  e  $7,0 \mu\text{mol} (\text{NO}_2) \text{ g}^{-1} (\text{MF}) \text{ h}^{-1}$  (DODDEMA et al., 1986 e ZORNOZA & GONZALEZ, 1998).

Tabela 2 - Efeito da concentração de  $\text{NO}_3^-$  sobre a atividade foliar das enzimas redutase do nitrato (RN - 24 e 48 horas após a adição do  $\text{NO}_3^-$ ), sintetase da glutamina (GS), sintase do glutamato dependente de ferredoxina (GOGAT-Fd) e desidrogenase do glutamato dependente de NADH (GDH-NADH) de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. Valores representam a média de cinco repetições.

$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mol m}^{-3}$ )	RN - 24 h [ $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1}(\text{MF})\text{h}^{-1}$ ]	RN - 48 h [ $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1}(\text{MF})\text{h}^{-1}$ ]	GDH [ $\mu\text{mol NAD}^+ \text{g}^{-1}(\text{MF})\text{h}^{-1}$ ]	GS [ $\mu\text{mol GHA g}^{-1}(\text{MF})$ ]
3,0	0,20	0,74	0,13	1,14
12,0	0,83	1,52	0,32	2,43
Significância	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
C.V. (%)	9,1	16,5	15,4	23,5

Considerando que a RN é uma enzima induzida pelo substrato, é possível supor que a sua baixa atividade nas folhas de mandioca pode estar relacionada com a menor concentração de  $\text{NO}_3^-$  no sítio de redução (Figura 2C) e não com a inibição pelos metabólitos nitrogenados, como tem sido sugerido para outras espécies por FAURE et al. (1991) e SIVASANKAR & OAKS (1995).

Pode-se observar, ainda, que plantas cultivadas sob baixas doses de  $\text{NO}_3^-$  apresentaram atividade da RN mesmo quando a concentração do íon esteve abaixo do limite de detecção (Tabela 2, tratamento 3,0 mol  $\text{m}^{-3}$ ). Segundo SOUZA (1994), o  $\text{NO}_3^-$  recém-absorvido e transportado para a parte aérea é mais importante para induzir a atividade da RN do que o estoque de  $\text{NO}_3^-$  que, normalmente, está localizado nos vacúolos celulares e não no citoplasma, onde se processa a sua redução. Com efeito, DODDEMA et al. (1986) observaram ser possível a existência de folhas com altas concentrações de  $\text{NO}_3^-$ , mas com baixa atividade da RN.

A atividade da GDH-NADH aumentou 2,5 vezes, em função do aumento no nível de  $\text{NO}_3^-$ , de 3,0 mol  $\text{m}^{-3}$  para 12 mol  $\text{m}^{-3}$  (Tabela 2). Embora existam citações mostrando que o  $\text{NO}_3^-$  possa diminuir ou não apresentar nenhum efeito sobre a atividade da GDH, a possibilidade maior é que, em trabalhos de longa duração, o  $\text{NO}_3^-$  estimule a atividade dessa enzima (SRIVASTAVA & SINGH, 1987), conforme aqui observado. No entanto, o efeito positivo do  $\text{NO}_3^-$  sobre a GDH-NADH parece ser indireto, via produtos de sua redução. Por exemplo, PEETERS & van LAERE (1992) verificaram que a inclusão de  $\text{NH}_4^+$  no meio de incubação promoveu um aumento na atividade da GDH muito maior do que quando se usou o  $\text{NO}_3^-$  como única fonte de nitrogênio. O aumento da atividade da GDH, quando se aumenta a proporção de  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva, também mostra que o  $\text{NH}_4^+$  e não o  $\text{NO}_3^-$ , seja mais efetivo em induzir a atividade da GDH (ZORNOZA & GONZALEZ, 1998).

O incremento no suprimento de  $\text{NO}_3^-$  aumentou a atividade da GS e GOGAT-Fd, em 113 e 160%, respectivamente. O aumento simultâneo e semelhante da atividade das duas enzimas mostra que elas atuam de forma coordenada na rota de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  denominada GS/GOGAT (LEA &

MINFLIN, 1974). Se a regulação da RN pelo  $\text{NO}_3^-$  é bem caracterizada, para a GS e GOGAT-Fd essa regulação ainda carece de estudos (SAKAKIBARA et al., 1997). Em relação à GS, WATANABE et al. (1985) observaram que, em milho, o aumento na concentração de  $\text{NO}_3^-$ , no meio de cultivo, aumentou a sua atividade, quando a massa fresca foi a base de expressão. No entanto, PURCINO et al. (1998) verificaram que o aumento na disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  tanto pode aumentar quanto reduzir a atividade da GS de alguns genótipos de milho. Em seringueira, a aplicação tanto do  $\text{NO}_3^-$  quanto do  $\text{NH}_4^+$  no meio de cultivo pode induzir aumentos na atividade da GS, muito embora o  $\text{NH}_4^+$  tivesse sido significativamente mais efetivo (LEMOS, 1996). Contudo, o uso de tungstênio, que inibe a atividade da RN e permite o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$ , mostrou que esse íon, *per se*, foi capaz de induzir aumentos na atividade da GS (CABELLO et al., 1998). Vale ressaltar que as plantas fertilizadas com os maiores níveis de  $\text{NO}_3^-$  também apresentaram os mais altos níveis de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3A), o que pode ter contribuído para o aumento da atividade da GDH e da GS no presente trabalho.

Em relação à GOGAT-Fd, DELÚ-FILHO (1994) mostrou que a nutrição níttrica promoveu aumentos na sua atividade. Em milho, a expressão do gene para a GOGAT-Fd e GOGAT-NADH foi aumentada em resposta à aplicação de  $\text{NO}_3^-$  (SAKAKIBARA et al., 1997) e, quando plantas de cevada foram cultivadas continuamente com  $\text{NO}_3^-$ , o mRNA, os níveis da proteína e a atividade da GOGAT-Fd tiveram aumentos consideráveis (PAJUELO et al., 1997). Esses resultados são semelhantes ao efeito positivo do nitrato sobre a atividade da GOGAT-Fd encontrado no presente trabalho (Tabela 2).

Em folhas de mandioca, o aumento na disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  leva ao aumento da atividade da RN (Tabela 2) e da fotorrespiração (Tabela 7), tendo como consequência o aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  celular. Assim, o aumento da atividade da GS, GOGAT-Fd e GDH-NADH também pode aumentar a assimilação e reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  e evitar o acúmulo desse íon, em níveis tóxicos. Esses resultados também concordam com os dados obtidos por EDWARDS & CORUZZI (1989), que mostraram haver uma relação positiva

entre o aumento do processo fotorrespiratório (principal formador de  $\text{NH}_4^+$  foliar) e a acumulação do mRNA da GS.

Quando se comparam as atividades da GS e GDH, verifica-se que a GDH representa apenas 12% do processo total de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  evidenciando a baixa contribuição da GDH para a assimilação e/ou reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  em folhas de mandioca.

A baixa atividade da RN em relação à GS, e a resposta positiva da GS ao aumento do  $\text{NH}_4^+$  celular, parecem indicar que o processo de redução do  $\text{NO}_3^-$  é mais limitante para o crescimento da mandioca do que o processo de assimilação do  $\text{NH}_4^+$ . De fato, tem-se noticiado que a reação catalisada pela RN é o passo metabólico que normalmente limita a assimilação de nitrogênio (FOYER et al., 1998). Assim, é factível sugerir-se que trabalhos de melhoramentos que visem aumentar a eficiência de redução do  $\text{NO}_3^-$  (maior absorção, transporte para o sítio de redução e, ou, atividade catalítica da RN) possam contribuir para a melhoria do desempenho produtivo da mandioca. No entanto, é possível observar que, apesar da baixa atividade da RN, as folhas de mandioca apresentam concentração de nitrogênio reduzido maior do que a de plantas com mais alta atividade da RN como, por exemplo, o sorgo (Gardner, 1994) e milho (PEREIRA, 1997).

## **2.0 - EFEITO DO NITROGÊNIO SOBRE A ALOCAÇÃO, PARTIÇÃO E ASSIMILAÇÃO DO CARBONO EM MANDIOCA**

Nas folhas, os teores de açúcares solúveis totais (AST) aumentaram linearmente com o incremento de  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva (Figura 6A). A composição de AST foi diferentemente afetada pela nutrição nitrogenada. Enquanto os açúcares redutores (AR), compostos basicamente por glicose e frutose, tiveram seus teores diminuídos, na medida em que as doses de  $\text{NO}_3^-$  aumentaram (Figura 6B), a concentração de açúcares não-redutores (ANR), compostos presumivelmente por sacarose, foi favorecida pela maior disponibili -

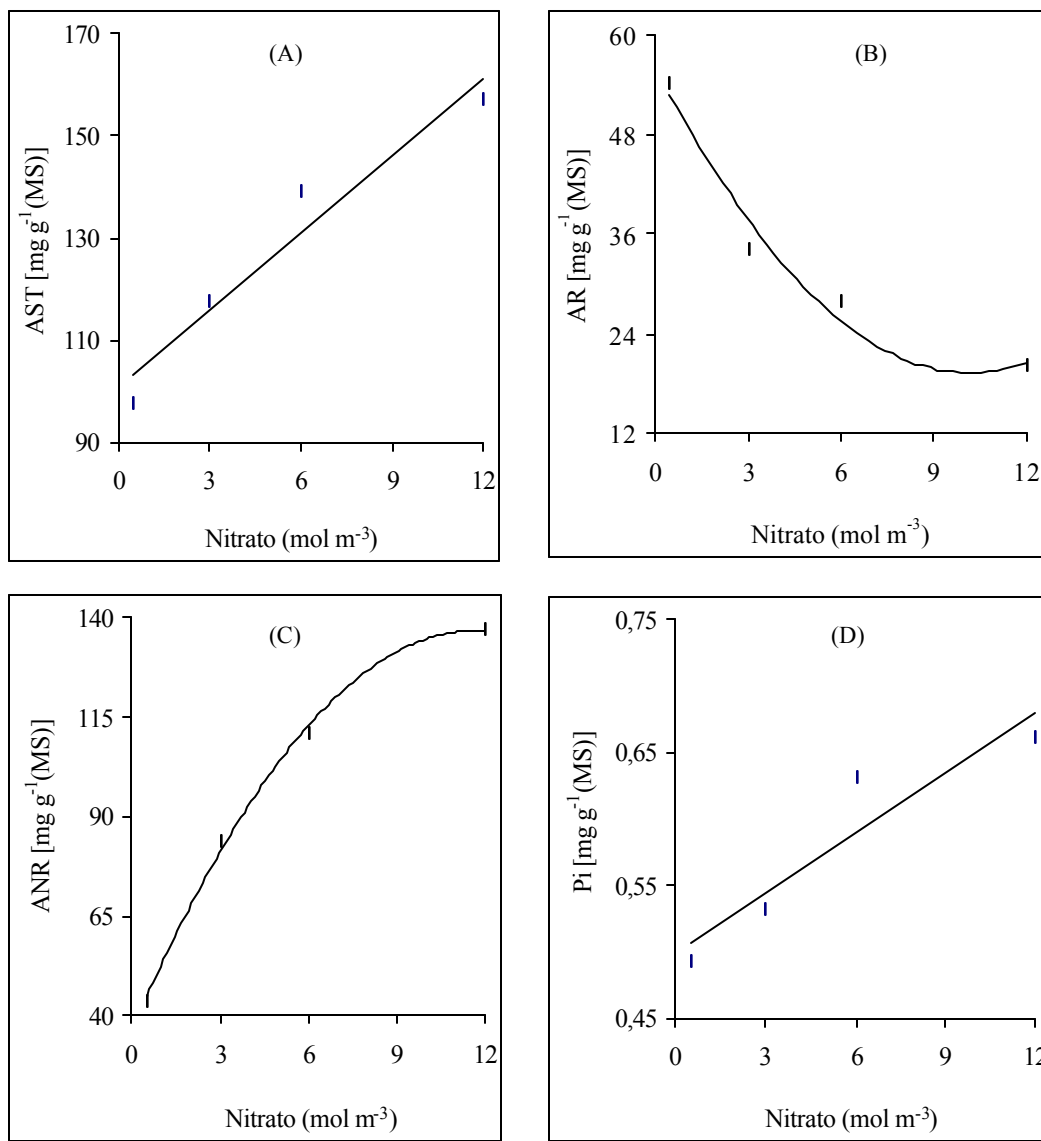


Figura 6 - Efeito da concentração do nitrato sobre os níveis de açúcares solúveis totais (AST) (A), açúcares redutores (AR) (B), açúcares não redutores (ANR) (C) e fósforo inorgânico (Pi) (D) das folhas de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. (Observar diferenças de escala). Valores representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: A – ( $y = 5,03x + 100,85$ ;  $R^2 = 0,94^{**}$ ); B – ( $y = 0,36x^2 - 7,28x + 56,33$ ;  $R^2 = 0,97^{**}$ ); C – ( $y = -0,74x^2 + 17,21x + 36,1$ ;  $R^2 = 0,99^{**}$ ) e D – ( $y = 0,016x + 0,50$ ;  $R^2 = 0,87^*$ ). \* e \*\* - significativos a  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente.

dade de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 6C). Resultados divergentes têm sido encontrados sobre o tipo de carboidrato solúvel que se acumula na fonte, em função da deficiência de  $\text{NO}_3^-$ . Em soja, RUFTY et al. (1988) verificaram aumentos nos teores de sacarose, mas, em cevada, WANG & TILLBERG (1996) observaram aumentos nos teores de glicose e frutose. Entretanto, em girassol, a concentração de nenhum dos três açúcares solúveis sofreu qualquer alteração, em função da deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (CIOMPI et al., 1996).

Vale salientar, que o efeito da deficiência severa de  $\text{NO}_3^-$  ( $0,5 \text{ mol m}^{-3}$ ) sobre a composição de AST foi altamente significativa, já que ela promoveu um aumento de 170% nos teores de AR e redução de 70% nos ANR foliares. Essa redução acentuada nos teores de ANR não era esperada, visto que mandioca é uma planta com grande capacidade de direcionar o fluxo de assimilados para a formação de sacarose. ANGELOV et al. (1993), por exemplo, observaram que, após 1 min da aplicação de  $^{14}\text{C}$ , 45% do carbono marcado foram detectados em sacarose, enquanto em soja e caruru (planta  $\text{C}_4$ ) detectaram-se, respectivamente, 34% e 25%.

A atividade das enzimas responsáveis pela hidrólise da sacarose está apresentada na Tabela 3. A sintase da sacarose (SS) não apresentou atividade detectável, possivelmente em função da SS ser uma enzima com maior atividade em tecidos que armazenam amido de reserva e em tecidos em crescimento; nestes, a sacarose é degradada e utilizada na síntese de polissacarídeos, com vistas à formação de novas paredes celulares (HELDT, 1997). Por outro lado, a atividade das invertases aumentou com o incremento da dose de  $\text{NO}_3^-$  no meio de cultivo (Tabela 3), fato também relatado por WANG & TILLBERG (1996), em cevada. Assim, a concentração reduzida de sacarose, verificada nas plantas cultivadas sob os níveis mais baixos de  $\text{NO}_3^-$ , não foi consequência de sua maior degradação.

As concentrações de Pi elevaram-se linearmente, em função do aumento nos níveis aplicados de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 6D). Segundo LAMAZE et al. (1984), os maiores teores de Pi nas folhas das plantas cultivadas com disponibilidade adequada de  $\text{NO}_3^-$  deve-se ao fato de que o  $\text{NO}_3^-$  dificulta o acúmulo de Pi no

vacúolo das células radiculares e favorece o seu carregamento no xilema. A consequência é o aumento no transporte de Pi para a parte aérea. Outra alternativa é que a redução na disponibilidade de Pi também poderia estar

Tabela 3 - Atividade foliar das enzimas invertase neutra (IN) e invertase ácida (IA) de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, sob dois níveis de  $\text{NO}_3^-$ . Valores representam a média de cinco repetições.

Nitrato ( $\text{mol m}^{-3}$ )	IN	IA
	$\mu\text{g glicose g}^{-1}(\text{MF}) \text{ min}^{-1}$	
3,0	35,7	134,6
12,0	59,22	266,1
Significância	$p < 0,05$	$p < 0,01$
C.V. (%)	25,2	12,53

relacionada com a menor formação de sacarose, como observado no presente trabalho. Isso porque, as frações de Pi utilizadas para a formação das trioses-fosfato, no cloroplasto, são liberadas quando da formação de sacarose, no citoplasma (HELDT, 1997).

A concentração de amido foi maior para as plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 7A). Resultados semelhantes foram encontrados por OPARKA et al. (1987), RUFTY et al. (1988), WANG & TILLBERG (1996) e GUIDI et al. (1998), em outras espécies. Uma das explicações para aquele resultado é que a deficiência de  $\text{NO}_3^-$  reduz o crescimento em maior proporção do que reduz a fotossíntese por unidade de área (Figura 1 e Tabela 5), fazendo com que o carbono assimilado e não exportado seja direcionado para a formação de amido.

Sob condições normais de crescimento, a maior formação de sacarose, e não de amido, na fonte, é importante para a manutenção de altos potenciais de turgescência no floema à altura da fonte, favorecendo, assim, a exportação dos

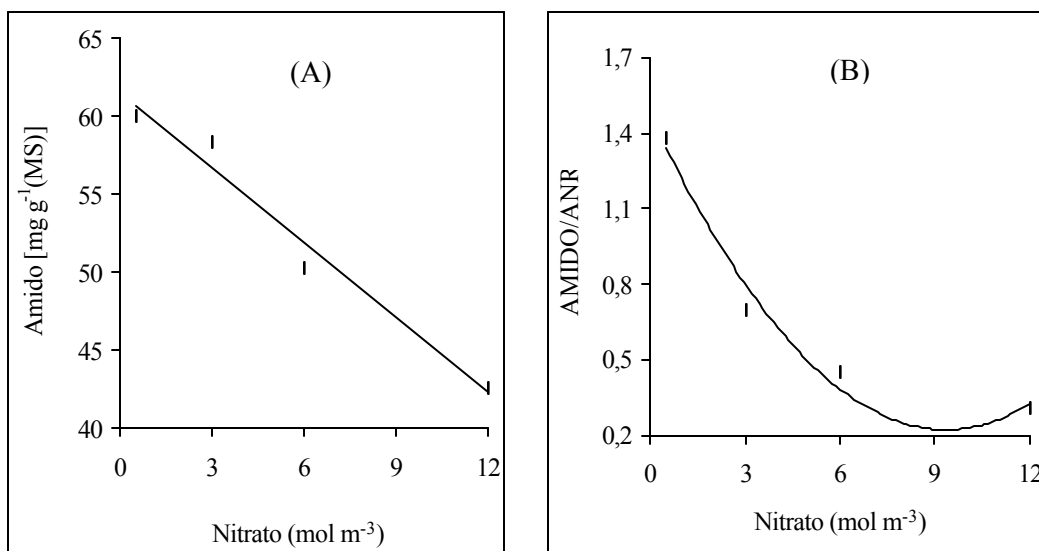


Figura 7- Efeito da concentração do nitrato sobre os níveis de amido foliar (A) e sobre a razão amido/ANR (açúcares não redutores) (B) das folhas de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. Valores representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: A – ( $y = 1,60x + 61,45$ ;  $R^2 = 0,97^*$ ); B – ( $y = 0,01x^2 - 0,27x + 1,48$ ;  $R^2 = 0,98^*$ ); \* significativo a  $p < 0,05$ .

compostos formados (SCHEIBLE et al., 1997) e estimulando o crescimento dos diversos drenos da planta. Em função disso, GALTIER et al. (1993) sugerem que a comparação da razão amido/sacarose pode fornecer indicação valiosa do efeito de determinado estresse sobre a alocação e o particionamento de fotoassimilados, entre as diferentes partes da planta. No presente trabalho, essa razão foi maior para as plantas cultivadas sob menor disponibilidade de nitrogênio (Figura 7B), indicando que algum fator reduziu o nível de exportação dos fotoassimilados produzidos e aumentou a capacidade para a formação de amido. Em contraste, OPARKA et al. (1987) observaram que, em batata, a deficiência de nitrogênio não reduziu a taxa de exportação de carbono, das folhas para os tubérculos. A diferença é que em batata a deficiência de nitrogênio não alterou, de forma significativa, a formação do principal dreno das plantas (tubérculos) e nem inibiu a formação de sacarose na folha (OPARKA et al, 1987). A conjunção desses dois fatores, fato não observado no presente trabalho, pode não concorrer para a redução da exportação do carbono assimilado.

A obtenção de uma correlação negativa entre ANR e amido (Figura 8A) é um indicativo de que a formação de amido ocorreu em detrimento da formação de sacarose. Resultados semelhantes foram obtidos por HUBER & ISRAEL (1982) e KERR et al. (1986) e pode ser explicados pelo fato de que a deficiência de  $\text{NO}_3^-$  inibe a atividade da sintase da sacarose fosfato e estimula a da pirofosforilase da ADPG.

A menor formação de aminoácidos e proteínas (Figuras 4A e 5A) também pode ter contribuído para o acúmulo de amido das plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$ . A explicação é que plantas cultivadas sob altos níveis de nitrogênio tendem a reduzir o fluxo de carbono em direção à formação de amido e a promover aumentos na síntese de ácidos orgânicos que podem ser utilizados como esqueletos de carbono para a formação de aminoácidos (SCHEIBLE et al., 1997). Ao contrário, quando a deficiência de nitrogênio é induzida, ocorre redução na demanda por fotoassimilados para a formação de aminoácidos e proteínas e um conseqüente aumento na disponibilidade de hexoses que podem ser utilizadas para a produção de amido (ROBINSON, 1996). A correlação posi-

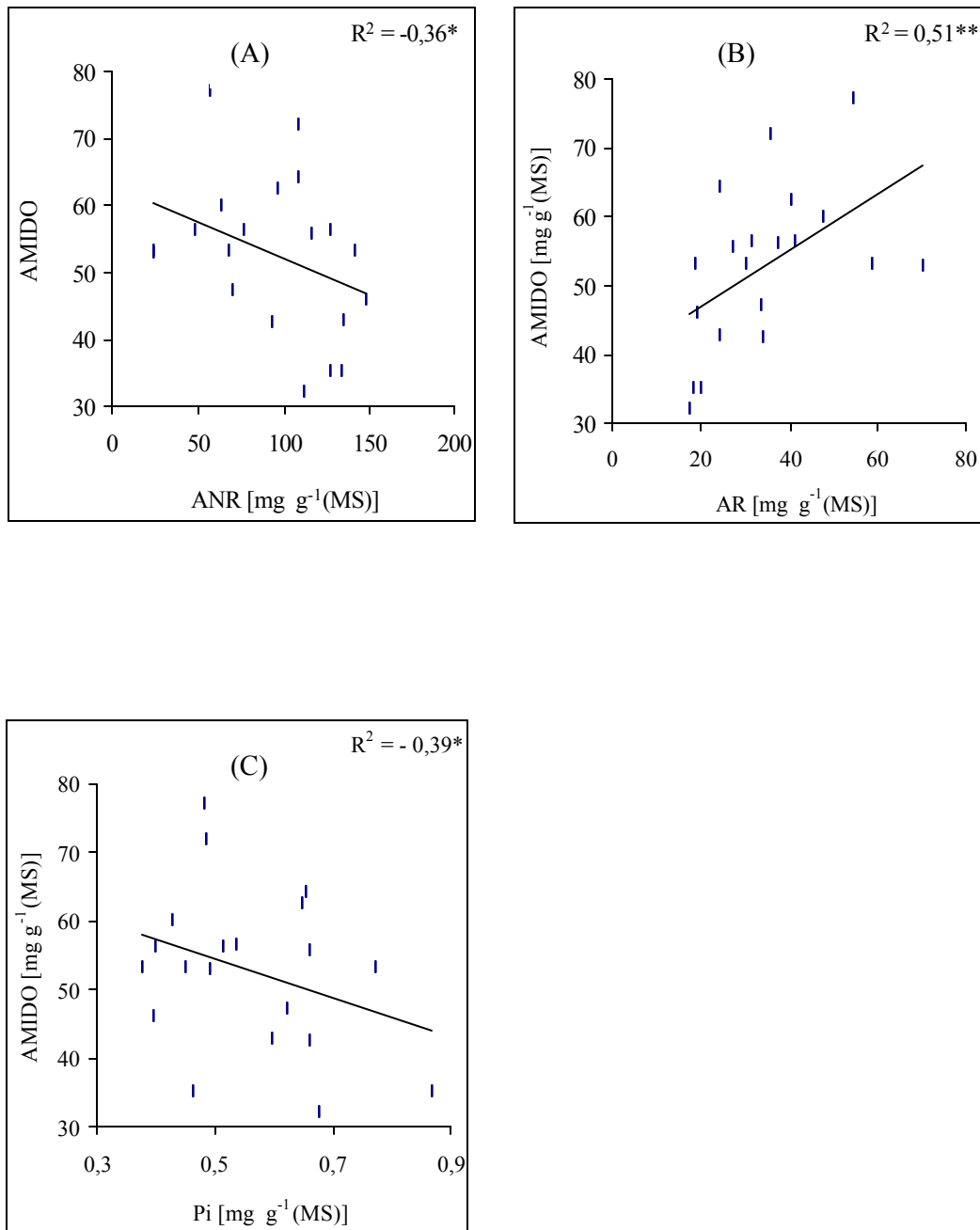


Figura 8- Relações entre amido e ANR (açúcares não redutores) (A), amido e AR (açúcares redutores) (B) e, amido e fósforo inorgânico (Pi) (C) das folhas de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva, com dois níveis de nitrato (3,0 e 12 mol m<sup>-3</sup>).

Valores representam a média de cinco repetições. \* e \*\* - significativos a  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente.

tiva entre AR e amido (Figura 8B) também dá suporte a idéia de que a maior disponibilidade de AR pode ter levado à maior formação de amido. Adicionalmente, a redução na concentração de Pi, que dificulta a saída de triose-fosfato do cloroplasto, onde o amido é formado, para o citoplasma, onde é formada a sacarose, pode ter contribuído para o aumento na formação de amido das plantas cultivadas sob estresse. Essa indicação é reforçada pela associação negativa entre Pi e amido (Figura 8C).

O aumento nos níveis de amido de plantas cultivadas sob deficiência de nitrogênio também pode ser conseqüência da redução na sua taxa de degradação. OPARKA et al. (1987) verificaram que a incorporação de  $^{14}\text{C}$  em amido foi semelhante, independente dos níveis de nitrogênio, e concluíram que baixas concentrações de nitrogênio foliar teriam maior influência na taxa de degradação, e não na síntese, do amido. Assim, existe a possibilidade de que o maior teor de amido verificado nas plantas cultivadas sob deficiência de nitrogênio também pode ter sido conseqüência da redução na sua taxa de degradação.

Nas raízes de absorção a concentração de AST foi maior para as plantas cultivadas com disponibilidade adequada de nitrogênio (Figura 9A). Contrariamente, o nível de amido foi maior para as plantas cultivadas sob déficit de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 9B). Tendência semelhante foi observada para as raízes tuberosas (Tabela 4).

Os valores de CNE das raízes de absorção das plantas cultivadas sob déficit de  $\text{NO}_3^-$  (0,5 e 3,0 mol  $\text{m}^{-3}$ ) foram semelhantes aos das plantas cultivadas sob 12 mol  $\text{m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 9C). Para as raízes tuberosas o CNE foi maior nas plantas cultivadas sob déficit de nitrogênio (Tabela 4). Assim, o menor crescimento das raízes de absorção e das raízes tuberosas (Figura 1), das plantas cultivadas sob déficit, não foi conseqüência da menor disponibilidade de fotoassimilados.

A razão amido/AST pode ser um indicativo da forma de utilização dos fotoassimilados que estão sendo importados da fonte. Nas raízes de absorção, a

maior razão obtida nas plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 9D), sugere que a taxa de utilização para o crescimento, à semelhança da taxa de

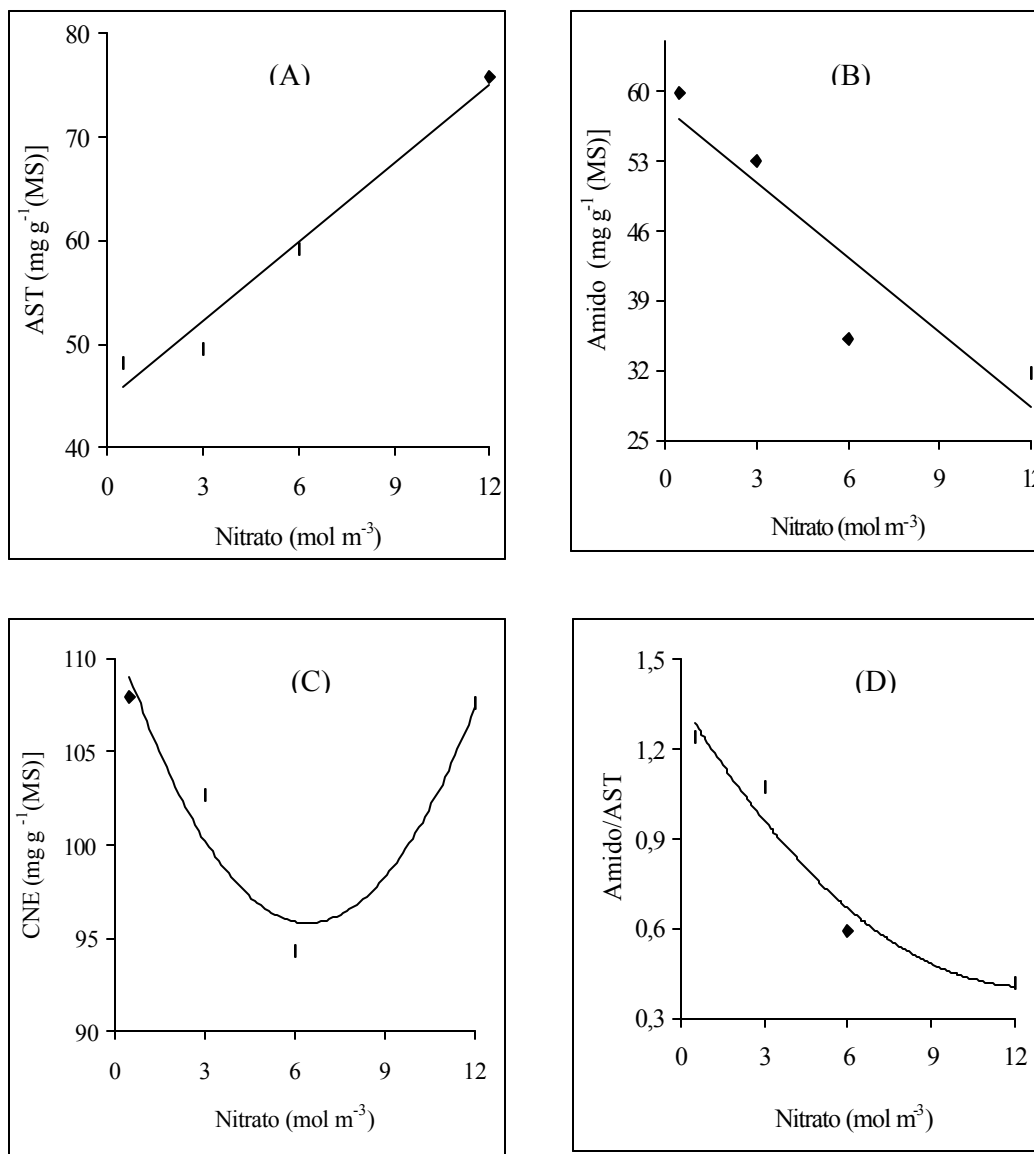


Figura 9 - Efeito da concentração do nitrato sobre os níveis de açúcares solúveis totais (AST) (A), amido (B), carboidratos não-estruturais (CNE) (C) e sobre a relação amido/AST (D) das raízes de absorção de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. (Observar diferenças de escala). Valores representam a média de cinco repetições. As equações de regressão são: A – ( $y = 2,53x + 44,56$ ;  $R^2 = 0,97^{**}$ ); B – ( $y = -2,51x + 58,60$ ;  $R^2 = 0,83^*$ ); C – ( $y = 0,37x^2 - 4,86x + 111,31$ ;  $R^2 = 0,92$ ) e D – ( $y = 0,006x^2 + 0,15x + 1,36$ ;  $R^2 = 0,96^{**}$ ). \* e \*\* - significativos a  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente.

Tabela 4 – Níveis de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), açúcares não-redutores (ANR), amido, carboidratos não-estruturais (CNE) e razão amido/ANR das raízes tuberosas de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, sob dois níveis de  $\text{NO}_3^-$ . Valores representam a média de cinco repetições.

$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mol m}^{-3}$ )	AST	AR	ANR	Amido	CNE	Amido/ANR
	$\text{mg g}^{-1}(\text{MS})$					
3,0	85,30 B*	6,09 C	79,70 B	821,27 A	906,57 A	10,63 A
6,0	119,69 AB	12,26 B	107,42 AB	648,16 B	767,85 A	6,14 B
12,0	141,48 A	17,84 A	123,65 A	693,07 B	834,55 A	5,61 B
C.V. (%)	19,22	26,12	18,43	13,23	12,7	22,76

\* Médias seguidas pelas mesma letras, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Duncan, em nível de 5%.

exportação das folhas, também foi reduzida nessas plantas. Mesmo para as raízes tuberosas, a alta razão obtida (Tabela 4), nessa fase (90 dias após o plantio), também indica baixa taxa de utilização dos AST para a promoção de seu crescimento

Nas plantas cultivadas sob baixa disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$ , foi verificada uma concentração foliar de sacarose bastante inferior à obtida nas plantas cultivadas sem deficiência (Figura 6C), resultado que se deveu, provavelmente, à redução na síntese e não à maior exportação ou hidrólise da sacarose. Foi observado, também, que o crescimento das raízes tuberosas, que são os principais drenos da mandioca, foi sensivelmente reduzido nas plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 1). Estes resultados, tomados em conjunto, sugerem que a menor produção de sacarose, na fonte, pode estar sendo controlada pela capacidade reduzida dos drenos de utilizar os fotoassimilados importados, e são consistentes com os resultados de KERR et al. (1986), que atribuíram o decréscimo na atividade da sintase da sacarose fosfato na folha (fonte) à redução que ocorreu na atividade dos diversos drenos da planta de soja. Segundo QIU e ISRAEL (1992), o mecanismo associado à menor utilização de fotoassimilado pelas diferentes partes da planta, sob deficiência mineral, precisa ser melhor estudado, visto que ainda não se têm idéias claras sobre o assunto. Para aqueles autores, existe a possibilidade da ocorrência de inibição de alguma enzima da via relacionada com a degradação do amido e, ou, algum efeito negativo indireto sobre a atividade dos drenos.

Além de promover alterações na alocação do carbono, em direção à formação do amido, a deficiência de nitrogênio também pode regular a taxa de assimilação do carbono. Neste trabalho, a fotossíntese aumentou com o aumento na disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  até o nível  $6 \text{ mol m}^{-3}$ , tendendo a estabilização à valores próximo de  $9 \text{ mol m}^{-3}$  (Figura 10A). A redução na taxa fotossintética, induzida pela deficiência severa ( $0,5 \text{ mol m}^{-3}$ ), em relação ao nível de  $12,0 \text{ mol m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$ , foi de 26,4%. Efeito positivo do nitrogênio sobre a fotossíntese de folhas de mandioca também já havia sido reportado anteriormente por TANKOU et al. (1990).

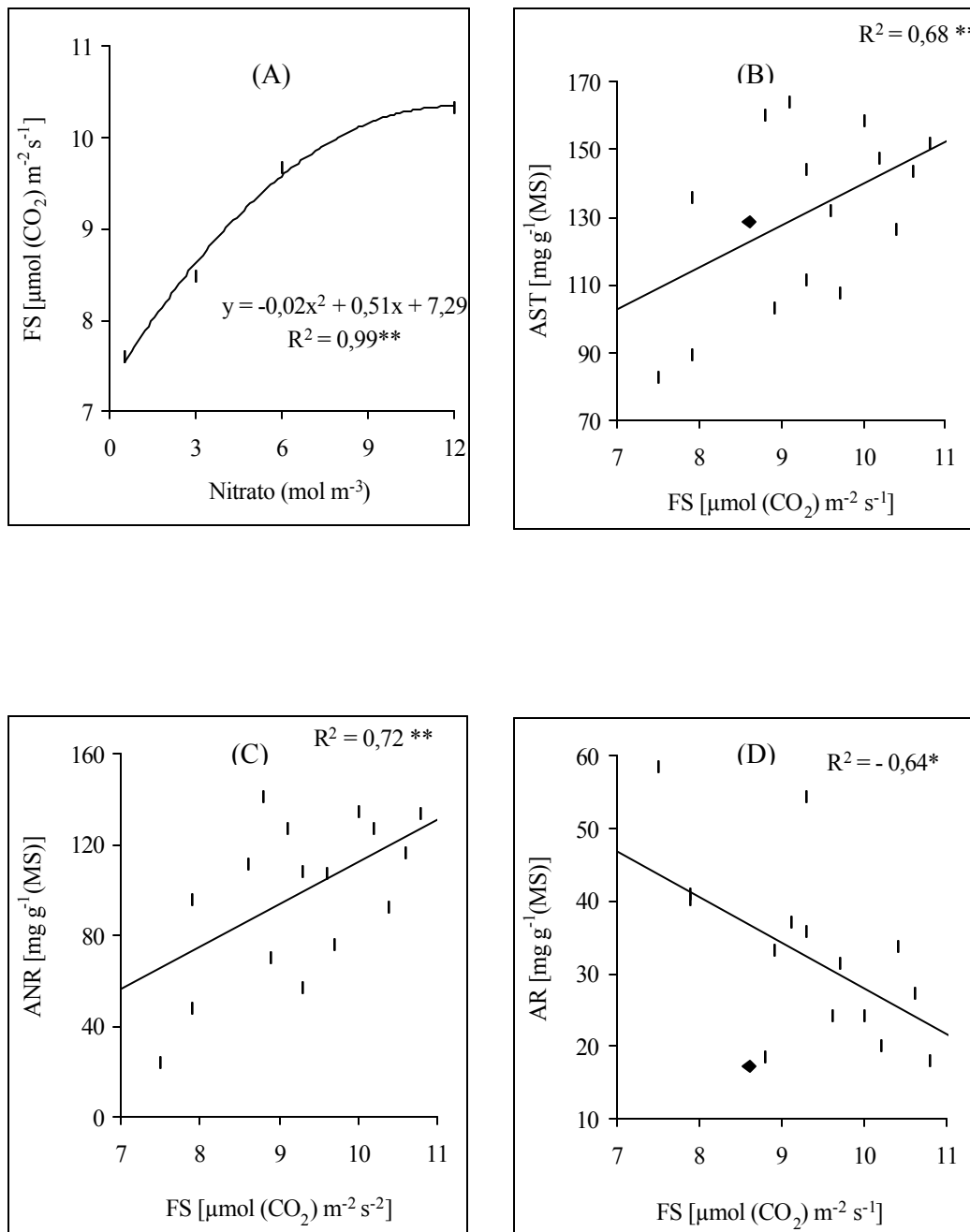


Figura 10 - Efeito da concentração do nitrato sobre a taxa fotossintética líquida (FS) (A), e sobre as relações entre FS e açúcares solúveis totais (AST) (B), FS e açúcares não redutores (ANR) (C); FS e açúcares redutores (AR) (D) das folhas de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, em solução nutritiva. Valores

representam a média de cinco repetições. \* e \*\* - significativos a  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente.

Pelos resultados observados na Figura 4A e Tabela 6 é possível supor que a redução na capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> das plantas cultivadas sob deficiência de nitrogênio esteja relacionada com a menor concentração de proteínas e redução na capacidade carboxilativa da Rubisco. Em adição a esses fatores, tanto os níveis de açúcares quanto a redução na disponibilidade de Pi, observados no presente trabalho, também podem ter colaborado para reduzir a capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> daquelas plantas. Em relação aos açúcares, GOLDSCHIMITD & HUBER (1992) e JANG & SHEEN (1994) mostraram que o seu acúmulo pode levar a um processo de retroinibição da fotossíntese. PAUL & DRISCOLL (1997) também constataram que a atividade da Rubisco foi negativamente afetada pelo acúmulo de açúcares que ocorreu nas plantas de milho cultivadas sob baixa disponibilidade de nitrogênio. Segundo FOYER (1988), a baixa demanda do dreno leva à redução na taxa de exportação e acúmulo de sacarose na fonte, que é percebida no citossol. Essa percepção provoca alterações no metabolismo do próprio citossol e, posteriormente, do cloroplasto, podendo levar a reduções na taxa de assimilação de carbono da planta. Em mandioca, também existem evidências sugerindo que a capacidade fotossintética de algumas variedades possa ser limitada pelo acúmulo de carboidratos nas folhas, em função da baixa capacidade dos drenos em utilizar os fotoassimilados produzidos (CIAT, 1991). No entanto, o mecanismo bioquímico e fisiológico que determinaria essa inibição ainda não está totalmente elucidado (KILB et al., 1996; PIETERS et al., 2001). A idéia é que pode ocorrer repressão, em nível de código genético, cujo objetivo seria de ajustamento da assimilação de CO<sub>2</sub>, em função da demanda por carboidratos pelos diferentes drenos da planta (JANG & SHEEN, 1994).

A correlação positiva entre a concentração de AST e fotossíntese (Figura 10B), a correlação positiva entre fotossíntese e ANR (Figura 10C) e a correlação negativa entre fotossíntese e AR (Figura 10D) evidenciam que as hexoses podem ter sido os açúcares responsáveis por parte dessa regulação negativa da fotossíntese. Resultados obtidos por FOYER (1988) também mostraram que, em plantas de espinafre e de soja, a glicose, e não a sacarose, foi mais efetiva em

causar retroinibição do processo de assimilação de  $\text{CO}_2$ . Adicionalmente, SHEEN (1990) observou que glicose, frutose e sacarose inibiram a expressão de sete genes relacionados à atividade fotossintética; contudo, a inibição que a sacarose normalmente causa à fotossíntese não se daria por sua ação direta, mas, por consequência das hexoses liberadas após a sua hidrólise (JANG & SHEEN, 1994).

Em relação ao Pi, FOYER (1988) observou que uma redução de 24% em seus níveis foi suficiente para causar alteração significativa na taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$ . Como no presente trabalho foi observada uma redução nos níveis de Pi em torno de 26% e 20%, respectivamente, para os estresses severo e moderado (Figura 6D), é possível sugerir que a redução dos teores de Pi também possa ter contribuído para a diminuição da taxa fotossintética nessas plantas. Como sugerido por LAUER et al. (1989), a deficiência de Pi pode ter reduzido a quantidade, a eficiência de carboxilação e o estado de ativação da Rubisco, reduzido a regeneração de alguns dos metabólitos do ciclo de Calvin (*e.g.* ribulose-1,5-bisfosfato) e provocado aumento no ponto de compensação para o  $\text{CO}_2$ .

A baixa correlação obtida entre amido e a taxa fotossintética ( $R^2 = -0,29$ ;  $p < 0,10$ ) demonstrou que a influência do amido, apesar de negativa, explica muito pouco da redução observada na fotossíntese.

### **3.0 - EFEITO DO NITROGÊNIO SOBRE AS TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* EM PLANTAS DE MANDIOCA**

A concentração de nitrogênio na folha foi de 45,8 mg  $\text{g}^{-1}$ (MS) e 28,1 mg  $\text{g}^{-1}$ (MS) para as plantas cultivadas com 12 mol  $\text{m}^{-3}$  e 3,0 mol  $\text{m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$ , respectivamente (Tabela 5). Segundo ASHER et al. (1980), em mandioca, a concentração de nitrogênio foliar abaixo de 50 mg  $\text{g}^{-1}$  (MS) pode ser considerada como indicativo de deficiência, podendo limitar a taxa fotossintética e a produ -

Tabela 5 - Nitrogênio total (N), taxa fotossintética líquida (FS), área foliar específica (AFE), teor de clorofila (Cl) total, teores de clorofila *a* e *b* e razão clorofila *a/b* em plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, sob dois níveis de  $\text{NO}_3^-$ . Valores representam a média de seis repetições.

$\text{NO}_3^-$	N	FS <sup>1</sup>	FS <sup>2</sup>	AFE	Cl total	Cl <i>a</i>
( $\text{mol m}^{-3}$ )	[ $\text{mg g}^{-1}$ (MS)]	[ $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{g}^{-1}(\text{MS}) \text{s}^{-1}$ ]	( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	( $\text{g m}^{-2}$ )	( $\text{g m}^{-2}$ )
3,0	28,12	8,33	0,24	0,029	0,60	0,48
12,0	45,81	10,48	0,34	0,033	0,83	0,70
Significância	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01
C.V. (%)	6,96	4,08	4,89	4,87	3,64	3,99

<sup>1</sup> Base de área

<sup>2</sup> Base de massa

ção de raízes tuberosas. No entanto, foi verificado, para a variedade utilizada no presente trabalho, que a concentração de nitrogênio foliar acima de 37 mg g<sup>-1</sup>(MS) apresentou pequena influência sobre a taxa fotossintética (Figuras 2A e 10A) e nenhuma influência sobre a produção de raízes tuberosas (Figura 1). Assim, é possível considerar-se que as plantas cultivadas sob 12 mol m<sup>-3</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não sofreram limitação de nitrogênio.

O resultado do efeito das doses de nitrogênio sobre a taxa fotossintética líquida está apresentado na Tabela 5. Vale ressaltar que a taxa fotossintética observada das plantas-controle, em torno de 10 μmol (CO<sub>2</sub>) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> está bem abaixo das taxas obtidas, em nível de campo, por EL-SHARKAWY et al. (1992), que registraram valores superiores a 40 μmol(CO<sub>2</sub>) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Como o presente experimento foi conduzido com uma variedade comercialmente já utilizada e essas plantas cresceram sem limitações de nutrientes, temperatura ou de água, é provável que a baixa irradiância, que normalmente ocorre no interior das casas de vegetação, tenha sido a principal causa da diferença tão acentuada na taxa fotossintética líquida. Em termos de irradiância, a mandioca é uma planta extremamente exigente e algumas variedades requerem altas intensidades de fluxo de fótons fotossintético, em torno de 1.800 μmol (fótons) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, para a obtenção de altas taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> e altas produtividades (EL-SHARKAWY et al., 1992).

A deficiência de nitrogênio provocou reduções significativas na taxa fotossintética líquida, quer expressa por unidade de área ou de massa foliar; no entanto, pode-se observar que, quando expressa por unidade de massa seca, a redução foi mais acentuada (30%) do que quando se usou a área como base de expressão (20%).

Foi verificada uma correlação alta e positiva entre a taxa fotossintética líquida e concentração de nitrogênio foliar (Figura 11). Observações semelhantes têm sido feitas para diversas espécies e são explicadas pelo fato de que a aplicação de níveis ótimos de nitrogênio determinam a formação de compostos relacionados à fotossíntese tais como, clorofilas, transportadores de elétrons e Rubisco (EVANS, 1989). Além disso, concentrações ótimas de nitrogênio podem

---

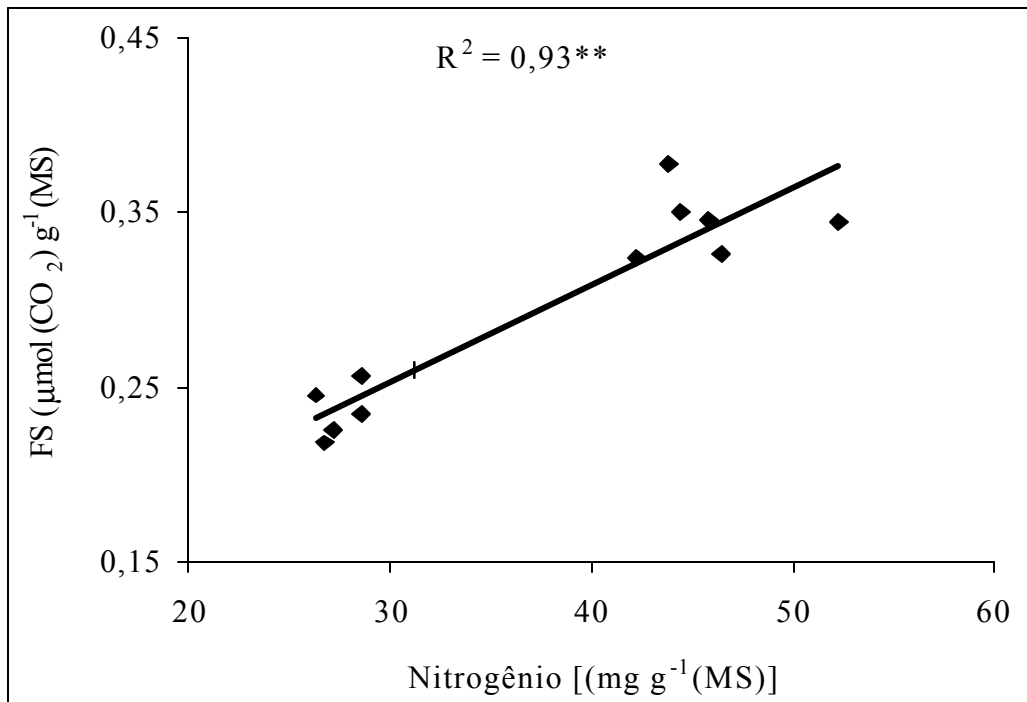


Figura 11 - Relação entre a concentração de nitrogênio foliar e a taxa fotossintética líquida ( $n = 12$ ) em plantas de mandioca cultivadas por 90 dias em solução nutritiva, com dois níveis de nitrato ( $3,0$  e  $12 \text{ mol m}^{-3}$ ). \*\* significativo a  $p < 0,01$

ser necessárias para a manutenção da atividade carboxilativa da Rubisco, como evidenciado na Tabela 6.

As plantas cultivadas sob deficiência de nitrogênio apresentaram menor área foliar específica (AFE) (Tabela 5). Redução em AFE tem sido associada ao aumento no teor de carboidratos, principalmente amido; ao aumento relativo do mesófilo foliar, devido ao incremento no número e, ou, tamanho de suas células (GARDNER et al., 1994); e ao aumento dos componentes protéicos tilacoidais e Rubisco (diversos autores citados por ZHANG et al., 1997). Algumas dessas alterações podem ser parte da estratégia das plantas para maximizar a atividade fotossintética (GARDNER et al., 1994). No entanto, AFE foi reduzida em apenas 12%, enquanto foi observada uma redução nos níveis de proteínas (Figura 4A) e aumento nos níveis de amido (Figura 7A) das plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$ . Além disso, a taxa fotossintética, quando expressa por unidade de massa, foi reduzida em maior proporção do que quando expressa com base na área (Tabela 5). Assim, a redução observada na AFE não parece ter sido uma estratégia das plantas para a maximização da atividade fotossintética, mas consequência do aumento no acúmulo de compostos orgânicos não relacionados ao processo de fixação do  $\text{CO}_2$ . Os resultados obtidos por van ARENDONK & POORTER (1994) e BROWN & BYRD (1997) também sugerem que, sob certas circunstâncias, a redução na AFE estaria mais relacionada ao aumento no teor de fibras e carboidratos estruturais e não-estruturais e não ao aumento no teor de proteínas.

A menor disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no meio de cultivo ( $3,0 \text{ mol m}^{-3}$ ) não alterou a concentração da clorofila *b*, mas reduziu a concentração de clorofila total, da clorofila *a* e da razão clorofila *a/b* (Tabela 5). A diminuição na razão clorofila *a/b*, pode significar alteração na composição do tilacóide, por aumentar a razão entre o fotossistema II/fotossistema I (Bjorkman, 1981 citado por ZHANG et al., 1997) e aumento na razão LHCII/FSII, ou seja, maior capacidade para minimizar a redução na captura da energia solar.

Contrariamente ao que ocorreu com a taxa fotossintética líquida baseada na área ou massa foliar, a taxa fotossintética, quando estimada com base na

Tabela 6 - Taxa fotossintética líquida (FS), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), taxa de carboxilação (CARBOX) e oxigenação (OXIG) da Rubisco de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, sob dois níveis de  $\text{NO}_3^-$ . Valores representam a média de seis repetições.

$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mol m}^{-3}$ )	FS <sup>3</sup> [ $\mu\text{mol (CO}_2\text{) g}^{-1}\text{(Cl) s}^{-1}$ ]	$g_s$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$C_i/C_a$	CARBOX ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
3,0	14,01	0,28	0,68	12,84
12,0	12,70	0,38	0,66	15,33
Significância	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01
C.V. (%)	4,78	9,55	1,20	4,04

<sup>3</sup> base de clorofila

concentração de clorofila, foi maior para as plantas cultivadas sob deficiência de nitrogênio (Tabela 6). Este resultado indica que plantas de mandioca, quando cultivadas sob condições de deficiência de nitrogênio, tornam-se mais eficientes na redução de  $\text{CO}_2$  por unidade de clorofila. Dados semelhantes foram obtidos em milho por KHAMIS et al. (1990) e em girassol por CIOMPI et al. (1996). Uma explicação para esse resultado é que, mesmo sob deficiência de nitrogênio, o direcionamento desse nutriente para a formação de componentes dos tilacóides, quando expressos por unidade de clorofila, permanece inalterado (EVANS, 1989). Essas observações são consistentes com os dados da fluorescência da clorofila *a*, em que não se observou redução na eficiência de captura da energia de excitação e apenas um ligeiro decréscimo na capacidade de transporte de elétrons (Tabela 8), mesmo quando se verificou uma redução bastante significativa na concentração de clorofila total (Tabela 5).

Nas plantas cultivadas sob deficiência de nitrogênio, a queda na taxa fotossintética expressa com base na área da folha (Tabela 5) foi acompanhada de redução na condutância estomática (Tabela 6), em consonância com os resultados obtidos em tomate por GUIDI et al. (1998). Além da condutância estomática, a razão  $C_i/C_a$  também tem sido usada para avaliar-se o efeito do movimento estomático sobre a taxa fotossintética. Apesar das diferenças estatísticas encontradas entre os valores de  $C_i/C_a$ , o aumento provocado pela deficiência de nitrogênio não foi acentuado (aproximadamente 3%) (Tabela 6). Vale ressaltar, que os valores encontrados para a razão  $C_i/C_a$  foram bem acima daqueles obtidos para mandioca por EL-SHARKAWY et al. (1992), mas estão condizentes com os valores próximos a 0,7, considerados normais para plantas  $C_3$ .

Basicamente, a resistência foliar à assimilação de  $\text{CO}_2$  pode ser desmembrada em três: estomática, mesofilica e carboxilativa. Em feijão, milho e algodão, a resistência mesofilica foi bastante incrementada pela deficiência de nitrogênio, enquanto o efeito sobre a resistência estomática foi pequeno (RYLE & HESKETH, 1969). Já em plantas de beterraba, a deficiência de nitrogênio afetou de forma significativa tanto a resistência estomática quanto a mesofilica (NEVINS & LOOMIS, 1970). No presente trabalho, os valores da condutância

estomática, da relação  $C_i/C_a$  e da taxa de carboxilação (Tabela 6), quando tomados em conjunto, parecem sugerir que a deficiência de nitrogênio impôs maior limitação à taxa fotossintética, pelas reduções que causou na capacidade carboxilativa e, muito provavelmente, na condutância mesofílica dessas plantas.

A deficiência de nitrogênio acarretou uma redução mais pronunciada na taxa fotossintética líquida do que na taxa transpiratória e, desse modo, causou uma redução na eficiência instantânea no uso de água ( $E_A$ ) de apenas 14%. (Tabela 5). Entretanto, em plantas de girassol observou-se que a redução na taxa fotossintética foi acompanhada por um aumento na taxa transpiratória, o que causou uma redução de 63% em  $E_A$  (CIOMPI et al., 1996). Esse resultado indica que plantas de mandioca têm grande capacidade para minimizar a perda de água sob condições de limitação de nitrogênio. Controle estomático eficiente também ocorre quando plantas de mandioca são cultivadas sob deficiência hídrica (EL-SHARKAWY & COCK, 1984).

Normalmente, folhas com alta atividade metabólica tendem a apresentar altas taxas respiratórias, como forma de manter as estruturas já formadas e suportar o crescimento de outras partes da planta que funcionam como dreno. LEWIS et al. (2000), inclusive, sugeriram a existência de correlação positiva entre a taxa respiratória e o crescimento das plantas. Além disso, RYAN (1991; 1995), avaliando diversas espécies, observaram a existência de uma forte relação linear e positiva entre a concentração de nitrogênio e a respiração de manutenção, isso devido ao fato de que entre 50 a 60% desse processo é usado para suportar o giro das proteínas (PENNING de VRIES, 1975). Surpreendentemente, foi observado que a deficiência de nitrogênio causou um aumento significativo na taxa de respiração foliar em aproximadamente 11% (Tabela 7), a despeito do menor crescimento (Figura 1) e da menor concentração de proteína foliar (Figura 4A).

A taxa respiratória total, em algumas circunstâncias, pode não ser um parâmetro apropriado na indicação da aclimatação metabólica que se processa na mitocôndria, em função da deficiência mineral, havendo a necessidade de se distinguir os diferentes tipos de respiração (THEODORU & PLAXTON, 1993).

Tabela 7 – Transpiração (E), eficiência no uso de água (E<sub>A</sub>), respiração escura (R), fotorrespiração (F), relação entre fotorrespiração e fotossíntese (F/FS), eficiência no uso do nitrogênio para a fotossíntese (E<sub>N</sub>) e relação entre a clorofila total e nitrogênio total (Cl/N) de plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, sob dois níveis de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Valores representam a média de seis repetições.

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mol m <sup>-3</sup> )	E (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	E <sub>A</sub> [μmol (CO <sub>2</sub> ) mmol H <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> ]	R [μmol (CO <sub>2</sub> ) m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	F [μmol (CO <sub>2</sub> ) m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	F/FS [μ
3,0	4,23	1,98	1,76	2,74	0,33
12,0	4,67	2,26	1,58	3,26	0,31
Significância	P<0,01	P<0,01	P<0,08	P<0,01	P<0,01
C.V.	3,58	4,91	8,12	3,93	2,22

Em condições normais, as reações associadas à respiração operam, em maior escala, no sentido de oxidar o NADH e FADH<sub>2</sub> e gerar ATP, usando, em uma das etapas do processo, a citocromo oxidase. No entanto, existem, nas plantas, vias alternativas (resistente à rotenona e oxidase alternativa) que geram pequeno gradiente eletroquímico de prótons através da membrana interna e formam menores quantidades de ATP (TAIZ & ZEIGER, 1998). Essas vias alternativas podem ser estimuladas por alguns estresses, tais como baixas temperaturas (PURVIS, 1997) e deficiência de Pi (THEODORU & PLAXTON, 1993). Adicionalmente, foi verificado que as plantas deficientes em nitrogênio apresentaram altas concentrações de hexoses (Figura 6B) e tem sido observado que o acúmulo desses açúcares pode estimular a respiração (PURVIS, 1997), já que as hexoses são o substrato que iniciam o processo glicolítico. Assim, sob condições de baixa demanda energética, a ativação da via da oxidase alternativa pode permitir a utilização desses açúcares, cujo acúmulo pode ser prejudicial ao metabolismo celular (HELDT, 1997), com a geração de pequena quantidade de ATP. LAMBERS (1982) também sugere que o aumento na taxa respiratória, que ocorre sob condições de estresse, pode estar relacionado com a dissipação do excesso de energia, que pode ser gerado em situações em que ocorre acúmulo de substrato respiratório e redução do crescimento. Assim, o aumento verificado na atividade respiratória (Tabela 7), possivelmente esteve relacionado ao aumento da atividade da oxidase alternativa e não das atividades respiratórias relacionadas com os processos de manutenção e, ou, de crescimento.

A taxa fotorrespiratória foi outro parâmetro significativamente reduzido (16%) pela menor disponibilidade de nitrogênio (Tabela 7). Entretanto, HÁK & NÁTR (1987) mostraram que, em cevada, a deficiência de nitrogênio levou ao aumento do processo fotorrespiratório. Dois resultados, no entanto, podem explicar grande parte da redução observada na taxa fotorrespiratória das plantas cultivadas sob 3,0 mol m<sup>-3</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: (i) a deficiência de nitrogênio reduziu a concentração de proteínas formadas (Figura 4A) e a Rubisco é a principal proteína foliar; assim, menores quantidades de Rubisco podem significar

menores quantidades de O<sub>2</sub> processadas e, (ii) a deficiência de nitrogênio reduziu a taxa de oxigenação da Rubisco (Tabela 6).

A razão entre a taxa fotorrespiratória e a taxa fotossintética líquida foi maior para as plantas cultivadas sob menor disponibilidade de nitrogênio (Tabela 7). Essa maior razão pode ter sido um fator adicional a contribuir para o menor acúmulo de massa seca dessas plantas (Figura 1).

Apesar da relação positiva entre a taxa fotossintética e os níveis de nitrogênio aplicados, foi verificado que a eficiência no uso do nitrogênio para a fotossíntese ( $E_N$  - calculada como a relação entre a taxa fotossintética líquida e o nitrogênio foliar) foi maior para as plantas cultivadas sob deficiência de NO<sub>3</sub> (Tabela 7). POOT et al. (1996) também mostraram que plantas de *Plantago lanceolata* L., cultivadas sob menor disponibilidade de nitrogênio, foram mais eficientes em utilizar o nitrogênio assimilado, já que uma redução de 24% no nitrogênio orgânico determinou uma redução de apenas 8% na taxa fotossintética. O aumento da  $E_N$ , em função da deficiência de nitrogênio, reside no fato de que as plantas direcionam, proporcionalmente, maiores quantidades do nitrogênio assimilado para compostos do aparelho fotossintéticos e, ou, altera a distribuição de nitrogênio entre os diferentes componentes desse aparelho (LAMBERS E POOTER, 1992). Resultados obtidos por POOT et al. (1996) indicaram que plantas deficientes em nitrogênio apresentaram melhoria na capacidade de captura e transferência de elétrons, por aumentar a partição do nitrogênio assimilado para a formação de clorofilas, enquanto mantiveram inalterada a relação entre Rubisco/nitrogênio. No presente trabalho, apesar de não se ter avaliado a relação Rubisco/nitrogênio, verificou-se que as plantas cultivadas sob estresse mantiveram a proporção de nitrogênio alocado para a formação das clorofilas, como pode ser visto pela razão clorofila/N (Tabela 7), o que também pode ter colaborado para o aumento da  $E_N$  dessas plantas. Adicionalmente, existe a possibilidade de que incrementos nos níveis de nitrogênio foliar, acima de um determinado valor, podem não ocasionar aumentos proporcionais na taxa fotossintética, porque o nitrogênio em excesso pode ser direcionado para a produção de compostos que não participam

diretamente da assimilação de  $\text{CO}_2$ . Essa suposição é reforçada pelo fato de que a taxa fotossintética líquida não foi muito incrementada quando se aumentou o nível de  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva, de 6,0 para 12,0 mol  $\text{m}^{-3}$  (Figura 10A), isso porque o nitrogênio adicional foi usado, em sua maior parte, para a produção de compostos insolúveis (Figura 3C).

### 3.1 - PARÂMETROS DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

A deficiência de nitrogênio reduziu a taxa fotossintética líquida, mas não provocou nenhum efeito negativo sobre a eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII), avaliada pela relação  $F_v/F_m$  (Tabela 8). Mesmo quando se usa a relação  $F_v/F_o$ , que, segundo LIMA et al. (1999), reflete de forma mais efetiva as alterações na fotoquímica do FSII, não se observa diferença entre os tratamentos. Também a eficiência da captura da energia de excitação pelos centros de reação dos FSII abertos ( $F_v'/F_m'$ ) não foi afetada (Tabela 8). Esses resultados sugerem que a energia absorvida foi utilizada e, ou, dissipada de forma eficiente e indica, ainda, que a maquinaria fotoquímica das folhas de mandioca toleraram a deficiência moderada de nitrogênio, como a aplicada no presente trabalho. Essas observações são semelhantes aos trabalhos com girassol (CIOMPI et al., 1996) e sorgo (CECHIN, 1998). No entanto, em espinafre (VERHOEVEN et al., 1997), tomate (GUIDI et al., 1998), feijão (LIMA et al., 1999) e milho (LU & ZHANG, 1999), observou-se que razão  $F_v/F_m$  decresceu devido a redução da disponibilidade de nitrogênio. As causas desses resultados divergentes podem estar relacionadas à intensidade e duração do estresse nutricional aplicado, bem como à maior eficiência na reciclagem e alocação do nitrogênio disponível, como sugerido por LIMA et al. (1999).

A fração da energia absorvida e utilizada no processo fotoquímico da planta (P) foi significativamente diminuída pela menor disponibilidade de nitrogênio (Tabela 8). Enquanto nas plantas-controle esse valor foi de 60,6%, nas plantas estressadas foi de 52%. Já a fração da energia dissipada no complexo antena (D) foi pequena (27% para as plantas-controle e 31%, para as plantas sob

Tabela 8 - Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* e características fotoquímicas do FSII em plantas de mandioca cultivadas por 90 dias, sob dois níveis de  $\text{NO}_3^-$ . Valores representam a média de seis repetições.

$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mol m}^{-3}$ )	$F_v/F_m$	$F_v/F_o$	$F_v'/F_m'$	ETR	1-qP	NPQ
3,0	0,86	5,89	0,69	6,22	0,24	1,59
12,0	0,85	6,01	0,73	6,87	0,17	1,11
Significância	N.S.	N.S.	N.S.	P<0,05	P<0,01	P<0,05
C.V. (%)	0,81	5,44	4,81	6,04	16,64	20,21

$F_v/F_m$  – relação entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima de folhas adaptadas ao escuro,  $F_v/F_o$  – relação entre a fluorescência variável e a fluorescência mínima,  $F_v'/F_m'$  – relação entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima de folhas adaptadas à luz, ETR – taxa de transporte de elétrons, 1-qP – grau de redução de  $Q_A$ , NPQ – “quenching” não-fotoquímico, P - fração da luz absorvida e usada para a fotoquímica do FSII e D – fração da luz absorvida e dissipada termicamente na antena.

deficiência de nitrogênio) e não sofreu variação em função da imposição do estresse (Tabela 8).

A menor disponibilidade de nitrogênio não alterou a eficiência na captura da energia de excitação da antena ( $F_v'/F_m'$ ), mas reduziu a taxa de transporte de elétrons (ETR), resultado que pode ser creditado ao estado de maior saturação de  $Q_A$  (maior valor de  $1-qP$ , Tabela 8). Essa saturação de  $Q_A$  pode ter advindo da menor capacidade de utilização de ATP e NADPH gerados na etapa fotoquímica da fotossíntese. Essa afirmativa pode ser reforçada pela redução que ocorreu na capacidade de assimilação de  $CO_2$  e na fotorrespiração (Tabela 5), dois dos principais processos acoplados ao consumo de ATP e NADPH. A baixa utilização de ATP e NADPH pode ter levado a um controle negativo e diminuído a proporção dos elétrons utilizados para a formação de novas moléculas de ATP e NADPH, como pode ser deduzido do menor valor de 'P' (Tabela 8).

O aumento observado em NPQ (Tabela 8) também pode ter sido uma estratégia da planta para que a produção de ATP e NADPH estivesse em equilíbrio com a quantidade utilizada no ciclo de redução do  $CO_2$ , e, assim, evitar a redução excessiva de  $Q_A$ . Assim, maior NPQ pode ter reduzido a pressão do excesso de energia de excitação sobre os fotossistemas, evitando, desse modo, a formação de espécies reativas de  $O_2$ , que poderiam levar ao processo de fotoinibição. Também foi verificado que a deficiência de nitrogênio, a despeito de ter reduzido a concentração total de clorofila, manteve inalterada a concentração de clorofila *b*, o qual pode ser mais um mecanismo importante de proteção do aparelho fotossintético (HUDÁK, 1997). Isso porque a clorofila *b*, que transfere energia para a clorofila *a*, é menos propensa à fotooxidação, devido, provavelmente, à sua maior eficiência na transferência da energia (CARPENTIER et al., 1997).

Como pode ser deduzido das relações  $F_v/F_m$  e  $F_v'/F_m'$ , do maior grau de redução de  $Q_A$  e do menor 'P', as reações da fase fotoquímica não foram as principais responsáveis pela menor taxa fotossintética verificada nas plantas cultivadas sob estresse de  $NO_3^-$ . Assim, a redução nos processos que levaram à menor capacidade de utilizar o NADPH e o ATP no ciclo redutivo do carbono foi

o fator responsável pela redução da taxa fotossintética. Esses dados são corroborados pela redução significativa de 40% nos níveis de proteínas (provavelmente grande parte delas associada à bioquímica da fotossíntese) e pela menor taxa de carboxilação da Rubisco observada para as plantas cultivadas sob deficiência de nitrogênio. TAN & HOGAN (1995) também concluíram que a redução na capacidade carboxilativa, e não a das reações fotoquímicas, foi a principal causa relacionada à obtenção de uma menor taxa fotossintética nas plantas de *Pinus banksiana* Lamb., cultivadas sob deficiência de nitrogênio.

A redução da razão  $Cl\ a/b$ , a manutenção das razões  $Cl/N$  e  $F_v/F_m$ , e a pequena redução em ETR, podem ser vantajosos para o processo de adaptação das plantas de mandioca cultivadas sob deficiência de nitrogênio, visto que elas podem rapidamente alcançar taxas fotossintéticas normais, caso a disponibilidade adequada de nitrogênio seja estabelecida. Isso porque, segundo TAN & HOGAN (1995), o processo de formação das proteínas solúveis, tais como Rubisco, é mais rápido do que a formação dos componentes da cadeia de transporte de elétrons, que são proteínas associadas à membrana.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Plantas de mandioca foram cultivadas em areia, utilizando-se soluções nutritivas contendo quatro níveis de  $\text{NO}_3^-$  (0,5; 3,0; 6,0 e 12,0 mol  $\text{m}^{-3}$ ). Noventa dias após o início do experimento, analisaram-se a massa seca, as frações de nitrogênio e composição de açúcares. Em um experimento adicional, e com apenas dois níveis de  $\text{NO}_3^-$  (3,0 e 12,0 mol  $\text{m}^{-3}$ ), foram realizadas medições de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e atividade foliar da sintase da sacarose (SS) e invertases ácida (IA) e neutra (IN). Os experimentos foram conduzidos em um delineamento de blocos ao acaso. A massa seca total aumentou com o incremento da aplicação de  $\text{NO}_3^-$ , tendendo à estabilização a partir de 9 mol  $\text{m}^{-3}$ . Os níveis de nitrogênio total variaram de 27,2 a 43,6 mg  $\text{g}^{-1}$  (MS), para as folhas, e de 8,6 a 16,0 mg  $\text{g}^{-1}$ (MS), para as raízes. As atividades da redutase do nitrato, desidrogenase do glutamato, sintetase da glutamina e sintase do glutamato aumentaram com o incremento da disponibilidade de nitrato. Apesar da baixa atividade da redutase do nitrato, em torno de 1,5  $\mu\text{mol}(\text{NO}_2^-) \text{g}^{-1}(\text{MF}) \text{h}^{-1}$ , os níveis de nitrogênio reduzido (nitrogênio total –  $\text{NO}_3^-$ ) foram altos e comparáveis aos de plantas com maior atividade da RN. As plantas apresentaram, ainda, alta capacidade de direcionar o nitrogênio reduzido para a formação de proteínas solúveis. Nas folhas, os teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares não-redutores (ANR) e fosfato inorgânico (Pi) aumentaram linearmente com o incremento dos níveis de  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva, mas os teores de amido e açúcares redutores (AR) diminuíram. Os teores de amido e AST das raízes de absorção e raízes tuberosas também aumentaram com o incremento dos níveis de  $\text{NO}_3^-$ . Sob deficiência de nitrogênio, houve aumento das razões amido/sacarose nas folhas e amido/AST nas raízes de absorção e raízes tuberosas, indicando, respectivamente, ter havido redução na capacidade de exportação de fotoassimilados das folhas e que a maior parte dos fotoassimilados direcionado

para as raízes foi utilizada para a formação de amido e não para a promoção do crescimento desses órgãos. A SS foliar não apresentou atividade detectável, enquanto as atividades da IA e IN foram reduzidas pelo menor suprimento de  $\text{NO}_3^-$ . Assim, a redução dos níveis de ANR das folhas daquelas plantas não foi consequência do aumento da degradação e nem da maior exportação, mas, provavelmente, a inibição de sua síntese. A deficiência de nitrogênio causou aumento na taxa respiratória total e no uso eficiente do nitrogênio para a fotossíntese ( $E_N$ ), mas reduziu a taxa fotossintética líquida, quando expressa por unidade de área e de massa, e a taxa fotorrespiratória. A taxa fotossintética líquida, expressa com base na concentração de clorofila total, foi maior para as plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$ . A menor disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  não provocou nenhum efeito negativo na eficiência fotoquímica do fotossistema II, indicando sua tolerância à deficiência moderada, ainda que prolongada, de  $\text{NO}_3^-$  como a imposta no presente experimento. A manutenção dos valores de  $C_i/C_a$ ,  $F_v/F_m$ ,  $F_v'/F_m'$  e aumento nos níveis de redução de  $Q_A$ , verificados nas plantas cultivadas sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$ , indicaram que a menor taxa fotossintética líquida (FS) não foi devido a limitações estomáticas e nem às reações da etapa fotoquímica. Redução em FS se deveu: (i) à menor concentração de proteínas, presumivelmente aquelas relacionadas com a etapa bioquímica da fotossíntese, (ii) à menor taxa de carboxilação da Rubisco, (iii) à menor disponibilidade de Pi e, (iv) à retroinibição devido ao acúmulo de açúcares-redutores.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ALGARSWAMY, G.; GARDNER, J.C.; MARANVILLE, J.W. & CLARCK, R.B. Measurement of instantaneous nitrogen use efficiency among pearl millet genotypes. **Crop Science**, 28:681-685, 1988.
- ANDERSON, J.M.; CHOW, W.S. & GOODCHILD, D.J. Thylakoid membrane organization. **Australian Journal of Plant Physiology**, 15:11-26, 1988.
- ANGELOV, M.N.; SUN, J.D.; BYRD, G.T.; BROWN, R.H. & BLACK, C.G. Novel characteristics of cassava (*Manihot esculenta* crantz) a reputed C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> intermediate photosynthesis species. **Photosynthesis Research**, 38:61-72, 1993.
- ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G. & HOWELLER, R.H. **Desórdenes nutricionales de la yuca** (*Manihot esculenta* Crantz). Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. 1980. 48p
- ASLAM, M.; TRAVIS, R.L. & HUFFAKER, R.C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in root uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology**, 99:1124-1133, 1992.
- BACHMANN, M.; HUBER, J.L.; LIAO, P.C.; GAGE, D.A. & HUBER, S.C. The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. **FEBS Letters**, 387:127-131, 1996.
- BARNEIX, A.J.; JAMES, D.M.; WATSON, E.F. & HEWITT, E.J. Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Sonja). **Planta**, 162:469-476, 1984.

- BARNES, J.D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S. & DAVISON, A.W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, 32:85-100, 1992.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.
- BUNGARD, R.A.; McNEIL, D. & MORTON, J.D. Effects of nitrogen on the photosynthetic apparatus of *Clematis vitalba* grown at several irradiances. **Australian Journal of Plant Physiology**, 24:205-214, 1997.
- CABELLO, P.; HABA, P. de la; GONZALEZ-FONTES, A. & MALDONADO, J.M. Induction of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase isoforms in sunflower cotyledons as affected by nitrate, light and plastid integrity. **Protoplasma**, 201:1-7, 1998.
- CARPENTIER, R. Influence of high light intensity of photosynthesis: Photoinhibition and energy dissipation. In: PESSARAKLI, M. (Ed.), **Handbook of Photosynthesis**. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 443-450.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E. & YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determinations of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, 6:71-80, 1975.
- CECHIN, I. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in two hybrids of sorghum under different nitrogen and water regimes. **Photosynthetica**, 35:233-240, 1998.
- CIAT – Cassava Program. Annual Report for 1987-1991. Cali - Colombia. 1991.
- CIOMPI, S.; GENTILI, E.; GUIDI, L. & SOLDATINI, G. F. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. **Plant Science**, 118:177-184, 1996.
- COCK, J. H. Characteristics of high yielding cassava varieties. **Experimental Agriculture**, 12:135-143, 1976.

- CRAWFORD, N.M.; WILKINSON, J.Q. & LABRIE, S.T. Control of nitrate reduction in plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, 19:377-385, 1992.
- DELÚ-FILHO, N. **Efeito do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre o crescimento e a atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. Lavras:UFLA, 1994. 87p. (Tese de Mestrado).
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W.; BAKER, D.H.; LOGAN, B.A.; BOWLING, D.R. & VERHOEVEN, A.S. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. **Physiologia Plantarum**, 98:253-264, 1996.
- DODDEMA, H.; STULEN, I. & HOFSTRA, J.J. The distribution of nitrate reductase in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves as affected by age. **Physiologia Plantarum**, 68:615-619, 1986.
- EDWARDS, J.W. & CORUZZI, G.M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant Cell**, 1:241-248, 1989.
- EDWARDS, J.W.; WALKER, E.L. & CORUZZI, G.M. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, 87:3459-3463. 1990.
- EGHBALL, B. & MARANVILLE, J. W. Root development and nitrogen influx of corn genotypes grown under combined drought and nitrogen stresses. **Agronomy Journal**, 85:147-152, 1993.
- EL-SHARKAWY, M A.. & COCK, J.H. Water use efficiency of cassava. I. Effects of air humidity and water stress on stomatal conductance and gas exchange. **Crop Science**, 24:497-502, 1984.
- EL-SHARKAWY, M.A.; TAFUR, S.M. de & CADAVID, L.F. Potential photosynthesis of cassava as affected by growth conditions. **Crop Science**, 32:1336-1342, 1992.

- EVANS, J.R. Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C<sub>3</sub> plants. **Oecologia**, 78:9-19, 1989.
- FAURE, J.D.; VICENTZ, M.; KRONENBERG, J. & CABOCHE, M. Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. **Plant Journal**, 1:107-113, 1991.
- FERNANDES, M.S. & FREIRE, L.R. Effects of nitric nitrogen applied to soil on nitrate reductase activity and soluble nitrogen in *Brachiaria* sp. **Turrialba**, 26:268-273, 1976.
- FOX, G.G.; RATCLIFFE, R.G.; ROBINSON, S.A. & STEWART, G.R. Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: commentary. **Canadian Journal of Botany**, 73:1112-1115, 1995.
- FOYER, C.H. Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, 26:483-492, 1988.
- FOYER, C.H.; VALADIER, M.H.; & MIGGE, A. & BECKER, T.W. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology**, 117:283-292, 1998.
- FREDEEN, A.L.; RAO, I.M. & TERRY, N. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. **Plant Physiology**, 89:225-230, 1989.
- FREEMAN, J.; MARQUEZ, A. J.; WALLSGROVE, R.M.; SAARELAINEN, R. & FORDE, B.G. Molecular analysis of barley mutants deficient in chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**, 14:279-311, 1990.
- GALANGAU, F.; DANIELVEDELE, F.; MOUREAUX, T.; THÉRÈSE, M.; DORBE, M.F.; LEYDECKER, M.T. & CABOCHE, M. Expression of leaf nitrate reductase from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiology**, 88:383-388, 1988.

- GALTIER, N.; FOYER, C.H.; HUBER, J.; VOELKER, T.A. & HUBER, S.C. Effects of elevated sucrose phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC82B). **Plant Physiology**, 101:535-543, 1993.
- GARDNER, J.C.; MARANVILLE, J.W. & PAPAROZZI, E.T. Nitrogen use efficiency among diverse sorghum cultivars. **Crop Science**, 34:728-733, 1994.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M. & BAKER, N.R. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, 990:87-92, 1989.
- GIVAN, C.V.; JOY, K.W. & KLECZKOWSKI, L.A. A decade of photorespiratory nitrogen cycling. **Trends in Biochemistry Science**, 13:433-437, 1988.
- GOLDSCHMIDT, E.E. & HUBER, S.C. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose and hexoses sugars. **Plant Physiology**, 99:1443-1448, 1992.
- GOMES, J.C. & HOWELER, R. **Produção de mandioca em solos de baixa fertilidade**. In: EMBRAPA/DDT. Práticas culturais da mandioca; Anais do seminário realizado em Salvador, Bahia, Brasil. 1980. Brasília, 1984. 245p (EMBRAPA/DDT, Documentos, 14).
- GOMES, M.M. de S. **Efeito do alumínio sobre a composição da fração nitrogenada e sobre as formas de transporte de nitrogênio em dois cultivares de sorgo** (*Sorghum bicolor* L. Moench). Viçosa, UFV, 1983. 41p. Tese de mestrado.
- GREENWOOD, D.J.; GASTAL, F.; LEMAIRE, G.; DRAYCOTT, A.; MILLARD, P. & NEETESON, J.J. Growth rate and % N of field grown crops: theory and experiments. **Annals of Botany**, 67:181-190, 1991.

- GUAZZELLI, E.M.F.M. **Efeitos do nitrato e amônio no crescimento, assimilação e eficiência de utilização de nitrogênio por cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na fase inicial do crescimento.** Lavras-UFLA. 1988 112p Tese de mestrado.
- GUIDI, L.; LOREFICE, G.; PARDOSSI, A.; MALORGIO, F.; TOGNONI, F. & SOLDATINI, G. F Growth and photosynthesis of *Lycopersicum esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. **Biologia Plantarum**, 40:235-244, 1998.
- HÁK, R & NÁTR, L. Effect of nitrogen starvation and recovery on carbon fluxes in photosynthetic carbon-reduction and oxidation cycles in young barley leaves. **Photosynthetica**, 21:15-22, 1987
- HÁK, R.; RINDERLE-ZIMMER, U.; LICHTENTHALER, H.K. & NÁTR, L. Chlorophyll a and fluorescence signatures of nitrogen deficient barley leaves. **Photosynthetica**, 28:151-159, 1993.
- HELDT, H.W. **Plant Biochemistry and Molecular Biology.** New York: Oxford University Press. 1997. 522p.
- HENLEY, W.J.; LEVAVASSEUR, G.; FRANKLIN, L.A.; OSMOND, C.B. & RAMUS, J. Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability. **Planta**, 184:235-243, 1991.
- HISCOX, J.D. & ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, 57:1332-34, 1979.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. Berkley, Univ. California, Agricultural Experimental Station. 39p (circular 349). 1938.
- HODGE, J.E. & HOFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry.** New York: Academic Press, 1962. v.1, p.380-394.

- HOELZLE, I. ; FINER, J.J.; McMULLEN, M.D. & STREETER, J.G. Induction of glutamine synthetase activity in nodulated roots of *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, 100:525-528, 1992.
- HOLE, D.J.; EMRAN, A.M.; FARES, Y. & DREW, M.C. Induction of nitrate transport in maize root and kinetics of influx measured with nitrogen-13. **Plant Physiology**, 93:642-647, 1990.
- HUBER, S.C. & ISRAEL, D.W. Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max* Merr) leaves. **Plant Physiology**, 69:691-696, 1982.
- HUDÁK, J. Photosynthetic apparatus. In: PESSARAKLI, M. (Ed.) **Handbook of Photosynthesis**. New York: Marcel Dekker, 1997, p28-48.
- IMSANDE, J. & TOURAINE, B. N demand and the regulation of nitrate uptake. **Plant Physiology**, 105:3-7, 1994.
- JACKSON, W.A.; KWIK, K.D. & VOLK, R.J. Nitrate uptake during recovery from nitrogen deficiency. **Plant Physiology**, 36:174-181, 1976.
- JANG, J.C. & SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **Plant Cell**, 6:1665-1679, 1994.
- KERR, P.S.; ISRAEL, D.W.; HUBER, S.C. & RUFTY; T.W.; Jr. Effect of supplemental NO<sub>3</sub> on plant growth and components of photosynthetic carbon metabolism in soybean (*Glycine max*). **Canadian Journal of Botany**, 64:2020-2027, 1986.
- KHAMIS, S. & LAMAZE, T. Maximal biomass production can occur in corn (*Zea mays* L.) in the absence of NO<sub>3</sub> accumulation in either leaves or roots. **Physiologia Plantarum**, 78:388-394, 1990.
- KHAMIS, S.; LAMAZE, T.; LEMOINE, Y. & FOYER, C. Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. Relationships between electron-transport and carbon assimilation. **Plant Physiology**, 94:1436-1443, 1990.

- KILB, B.; WIETOSKA, H. & GODDE, D. Changes in the expression of photosynthetic genes precede loss photosynthetic activities and chlorophyll when glucose is supplied to mature spinach leaves. **Plant Science**, 115:225-235, 1996.
- KING, B. J.; SIDDIQI, M.Y.; RUTH, T. J. WARNER, R.L. & GLASS, A.D.M. Feedback regulation of nitrate influx in barley root by nitrate, nitrite and ammonium. **Plant Physiology**, 102:1279-1286, 1993.
- KING, B.J.; SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity – Implication for nitrate influx. **Plant Physiology**, 99:1582-1589, 1992.
- KOLBER, Z.; ZEHR, J. & FALKOWSKI, P. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. **Plant Physiology**, 88:923-929, 1988.
- KOZLOWSKI, T.T & PALLARDY, G.S. **Physiology of Woody Plants**. California: Academic Press, Inc. 1997. 411p.
- LAMAZE, T.; SENTENAC, H. & GRIGNON, C. Effects of nitrate on phosphate accumulation and transport by corn roots. **Physiologie Végétale**, 22:155-161, 1984.
- LAMBERS, H. & POORTER, H. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. **Advance in Ecological Research**, 23:187-261, 1992.
- LAMBERS, H. Cyanide-resistant respiration – a non-phosphorylating electron-transport pathway acting as an energy overflow. **Physiologia Plantarum**, 55:478-485, 1982.
- LAUER, M.J.; PALLARDY, S.G.; BLEVINS, D.G. & RANDALL, D.D. Whole leaf carbon exchange characteristic of phosphate deficient soybean (*Glycine max* L.). **Plant Physiology**, 91:848-854, 1989.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. **Nature**, 251:614-616. 1974

- LEE , R.B.; PURVES, J.V.; RATCLIFFE, R.G. & SAKER, L.R. Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. **Journal of Experimental Botany**, 43:1385-1396, 1992.
- LEMOS, G.B. de **Crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio.** Lavras:UFLA, 1996. 56p. (Tese de Mestrado).
- LEWIS, O. A.M.; JAMES, D.M. & HEWITT, E.J. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L. c.v. Mazurka) in response to nitrate and ammonium. **Annals of Botany**, 49:39-49, 1982.
- LEWIS, C.E.; NOCTOR, G.; CAUSTON, D. & FOYER, C.H. Regulation of assimilate partitioning in leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, 27:507-519, 2000.
- LI, X.Z. & OAKS, A. The effect of light on the nitrate and nitrite reductases in *Zea mays*. **Plant Science**. 109:115-118, 1995.
- LICHTENTHALER, H.K. & RINDERLE, U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 19:29-85, 1988.
- LIMA, J.D.; MOSQUIM, P.R. & DA MATTA, F.M. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris* as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. **Photosynthetica**, 37:113-121, 1999.
- LINDEMAN, W. Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light. **Proc. 2<sup>nd</sup> U. N. International Conference on the peaceful uses of atomic energy**, 24:8-15, 1958.
- LU, C.M. & ZHANG, J.H. Photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. **Plant Science**, 151:135-143, 2000.
- LU, J.L.; ETRL, J.R. & CHEN, C.M. Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. **Plant Molecular Biology**, 14:585-594, 1990.

- MAE, T. Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis and yield potential. **Plant and Soil**, 196:201-210, 1997.
- MARQUEZ, A.J.; AVILA, C.; FORD, B.G. & WALLSGROVE, R.M. Ferredoxin-glutamate synthase from barley leaves: rapid purification and partial characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**, 26:645-651, 1988.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: London Academic Press, 1995. 889p.
- MATOH, T.; SUZUKI, F. & IDA, S. Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of enzyme. **Plant and Cell Physiology**, 20:1329:1340, 1979.
- MATTANA, M.; CORAGGIO, I.; BRAMBILLA, I.; BERTANI, A. & REGGIANI, R. Nitrate assimilation during the anaerobic germination of rice: expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase. **Planta**. 199:74-78, 1996.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, 51:659-668, 2000.
- McNALLY, S.F.; HIREL, B.; GADAL, P.; MANN, A.F. & STEWART, G.R. Glutamine synthetase of higher plants: evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. **Plant Physiology**, 72:22-25, 1983.
- MIGGE, A. & BECKER, T. W. In tobacco leaves the genes encoding the nitrate reducing or the ammonium assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen sources. **Plant Physiology and Biochemistry**. 34:665-671, 1996.
- MIGGE, A.; CARRAYOL, E.; KUNZ, C.; HIREL, B.; FOCK, H.; & BECKER, T. The expression of tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate nitrate reduction and is unaffected by suppression of photorespiration. **Journal of Experimental Botany**, 48:1175-1184, 1997.

- MOORE, S. & STEIN, W.H. Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, 176:367-388, 1948.
- MORAES, O de.; MONDARDO, E.; VIZZOTTO, V.J. & MACHADO, M.O. **Adubação química e calagem da mandioca**. Florianópolis, EMPASC, 1981. 20p. (EMPASC. Boletim Técnico, 8).
- MOSQUIM, P.R. **Influência do alumínio sobre o crescimento e metabolismo em plantas de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Viçosa:UFV, 1978. 29p. (Tese de Mestrado).
- MULLER, B. & TOURAINE, B. Inhibition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. **Journal of Experimental Botany**, 43:617-623, 1992.
- NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, 153:375-380, 1944.
- NEVINS, D.J. & LOOMIS, R.S. Nitrogen nutrition and photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Crop Science**, 10:21-25, 1970.
- NUNES, M.A.; RAMALHO, J.D.C. & DIAS, M.A. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. **Journal of Experimental Botany**, 44:893-899, 1993.
- OAKS, A. Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. **Canadian Journal of Botany**, 73:1116-1117, 1995.
- OELMULLER, R. & BRIGGS, W.R. Intact plastids are required for nitrate and light induced accumulation of nitrate reductase activity and mRNA in squash cotyledons. **Plant Physiology**, 92:434-439, 1991.
- OPARKA, K.J.; DAVIES, H.V. & PRIOR, D.A.M. The influence of applied nitrogen on export and partitioning of current assimilate by field-grown potato plants. **Annals of Botany**, 59:311-323, 1987.
- PAJUELO, P.; PAJUELO, E.; FORDE, B.G. & MÁRQUEZ, A.J. Regulation of the expression of ferredoxin-glutamate synthase in barley. **Planta**, 203:517-525, 1997.

- PATE, J.S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology**, 31:313-340, 1980.
- PATE, J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. **Soil Biology and Biochemistry**, 5:109-111, 1972.
- PAUL, M.J. & DRISCOLL, S.P. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source-sink imbalance. **Plant Cell and Environment**, 20:110-116, 1997.
- PEETERS, K.M.U. & Van LAERE, A.J. Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. **Physiologia Plantarum**, 84:243-249, 1992.
- PENNING de VRIES, F.W.T. The cost of maintenance process in plant cell. **Annals of Botany**, 39:77-92, 1975.
- PEÑUELAS, J.; BIEL, C. & ESTIARTE, M. Changes in biomass, chlorophyll content and gas exchange of beans and peppers under nitrogen and water stress. **Photosynthetica**, 29:535-542, 1993.
- PEREIRA, J.F. & SPLITTSTOESSER, W.E. Nitrate reduction by cassava. **Plant and Cell Physiology**, 27:925-927, 1986.
- PEUKE, A.D.; HARTUNG, W. & JESCHKE, W.D. The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I. Grown with low and high nitrate supply. **Journal of Experimental Botany**, 45:733-740, 1994.
- PIETERS, A.J.; PAUL, M.J. & LAWLOR, D.W. Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. **Journal of Experimental Botany**, 52:1083-1091, 2001.
- POOT, P.; PILON, J. & PONS, T.L. Photosynthetic characteristics of leaves of male-sterile and hermaphrodite sex type of *Plantago lanceolata* grown under conditions of contrasting nitrogen and light availabilities. **Physiologia Plantarum**, 98:780-790, 1996.
- PURCINO, A.A.C.; ARELLANO, C. ATHWAT, G.S. & HUBER, S.C. Nitrate effects on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. **Maydica**, 43:83-94, 1998.

- PURVIS, A.C. The role of adaptive enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plant tissue. **HortScience**, 32:1165-1168, 1997.
- QIU, J. & ISRAEL, D.W. Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus deficient soybean plants. **Plant Physiology**, 98:316-323, 1992.
- RADIN, J.W. & BOYER, J.S. Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants. Role of hydraulic conductivity and turgor. **Plant Physiology**, 69:771-775, 1982.
- RADIN, J.W. A physiological basis for the division of nitrate assimilation between root and leaves. **Plant Science Letters**, 13:21-25, 1978.
- RADIN, J.W. & ACKERSON, R.C. Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency. 3. Stomatal conductance, photosynthesis and abscisic acid accumulation during drought. **Plant Physiology**, 67:115-119, 1981.
- RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W. & MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, 51:277-280, 1981.
- REDINBAUGH, M.G. & CAMPBELL, W.H. Higher plant responses to environmental nitrate. **Physiologia Plantarum**, 82:640-650, 1991
- ROBINSON, J.M. Leaflet photosynthesis rate and carbon metabolite accumulation patterns in nitrogen-limited, vegetative soybean plants. **Photosynthesis Research**, 50:133-148, 1996.
- RUFTY, T.W.; Jr RAPER, C.D.; Jr. & HUBER S.C. Alterations in internal partitioning of carbon in soybean plants in response to nitrogen stress. **Canadian Journal of Botany**, 62:501-508, 1984.
- RUFTY, T.W.; Jr.; HUBER, S.C. & VOLK, R.J. Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. **Plant Physiology**, 88:725-730, 1988.
- RUFTY, T.W.; Jr.; MacKOWN, C.T. & VOLK, R.J. Alterations in nitrogen assimilation and partitioning in nitrogen stressed plants. **Physiologia Plantarum**, 79:85-95, 1990.

- RYAN, M.G. Foliar maintenance respiration of ubalpini and boreal trees and shrubs in relation to nitrogen contents. **Plant Cell and Environment**, 18:765-772, 1995.
- RYAN, M.G. The effects of climate changes on plant respiration. **Ecological Application**, 1:157-167, 1991.
- RYLE, G.J.A. & HESKETH, J.D. Carbon dioxide uptake in nitrogen deficient plants. **Crop Science**, 9:451-455, 1969.
- SAKAKIBARA, H.; KOBAYASHI, K.; DEJI, A. & SUGIYAMA, T. Partial characterization of the signaling pathway for the nitrate-dependent expression of genes for nitrate-assimilatory enzymes using detached maize leaves. **Plant and Cell Physiology**, 38:837-843, 1997.
- SÁNCHEZ-GUERREIRO, I; CABA, J.M.; LIUCH, C. & LIGERO, F. Nitrate uptake by *Vicia faba* L. plants: a physiological approach. **Journal of Plant Nutrition**, 21:2589-2599, 1998.
- SANTANA, A.M.; CARVALHO, J.E.B. de & BORGES, I. Competição de fontes de nitrogênio em solos para a mandioca. In: BAHIA. Universidade Federal. Escola de Agronomia. Projeto Mandioca. Cruz das Almas, Convênio UFBA/BRASCAN NORDESTE, 1975. p. 39-55.
- SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZ-FONTES, A.; LAUERER, M.; MULLER-ROBER, B.; CABOCHE, M. & STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, 9:783-798, 1997.
- SECHLEY, K.A.; YAMAYA, T. & OAKS, A. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. **International Review of Cytology**, 134:85-163, 1992.
- SEHTIYA, H.L. & GOYAL, S.S. Comparative uptake of nitrate by intact seedlings of C<sub>3</sub> (barley) and C<sub>4</sub> (corn) plant: Effects of light and exogenously supplied sucrose. **Plant and Soil**, 227:185-190, 2000.

- SEITH, B.; SETZER, B.; FLAIG, H. & MOHR, H. Appearance of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase in different organs of the scot pine (*Pinus sylvestris*) seedling as affected by light, nitrate and ammonium. **Physiologia Plantarum**, 91:419-426, 1994.
- SHARKEY, T.D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. **Physiologia Plantarum**, 73:147-152. 1988.
- SHEEN, J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **Plant Cell**, 2:1027-1038, 1990.
- SIDDIQI, M.Y.; GLAS, A.D.M; RUTH, T.J. & FERANDO, M. Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using  $^{13}\text{NO}_3$ . **Plant Physiology**, 90:806-813, 1989.
- SIVASANKAR, S. & OAKS, A. Nitrate assimilation in higher plants: the effects of metabolites and light. **Plant Physiology and Biochemistry**, 34:609-620, 1996.
- SIVASANKAR, S. & OAKS, A. Regulation of nitrate reductase during early seedling growth: a role for asparagine and glutamine. **Plant Physiology**, 107:1225-1231, 1995.
- SOOD, C.R.; CHANDA, S.V. & SINGH, Y.D. Effect of plant regulators and different nitrogen sources on glutamate dehydrogenase activity. **Journal of Plant Nutrition**, 22:1351-1364, 1999.
- SOLOMONSON, L.P. & BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 41:225-253, 1990.
- SOUZA, V. F. de **Influência de fatores na expressão da atividade da redutase do nitrato em tomateiro** (*Lycopersicon esculentum* Mill). Viçosa-UFV. 1994. 116p. (Tese de Mestrado)
- SRIVASTAVA, H.S. & SINGH, R.P. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. **Phytochemistry**, 26:597-610, 1987.

- SUGIHARTO, B.; MIYATA, K.; NAKAMOTO, H. SASAKAWA, H. & SUGIYAMA, T. Regulation of expression of carbon-assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. **Plant Physiology**, 92:963-969, 1990.
- SUZUKI, A.; VIDAL, J. & GADAL, P. Glutamate synthase isoforms in rice: immunological studies of enzymes in green leaf etiolated leaf and root tissues. **Plant Physiology**, 70:827-831, 1982.
- TAIZ, L. & ZEIGER E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. 1998. 792 p.
- TALOUIZTE, A.; GUIRAUD, G.; MOYSE, A.; MAROL, C. & CHAMPIGNY, M.L. Effect of previous nitrate deprivation on  $^{15}\text{NO}_3^-$  absorption and assimilation by wheat. **Journal of Plant Physiology**, 116:113-122, 1984a.
- TALOUIZTE, A.M.; CHAMPIGNY, M.L. BISMUTH, E. & MOYSE, A. Root carbohydrate metabolism associated with nitrate assimilation in wheat previously deprived of nitrogen. **Physiologie Végétale**, 22:19-27, 1984b.
- TAN, W. & HOGAN, G.D. Limitation to net photosynthesis as affected by nitrogen status in jack-pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. **Journal of Experimental Botany**, 46:407-413, 1995.
- TANKOU, C.M; SCHAFFER, B.; O'HAIR, S.K. & SANCHEZ, C. A. Nitrogen shading duration, gas exchange and growth of cassava. **HortScience**, 25:1293-1296, 1990.
- TEYKER, R.H; JACKSON, W.A.; VOLK, R.J. & MOLL, R.H. Exogenous  $^{15}\text{NO}_3^-$  influx and endogenous  $^{14}\text{NO}_3^-$  efflux by maize (*Zea mays* L.) inbreeds during nitrogen deprivation. **Plant Physiology**, 86:778-781, 1988.
- THEODOROU, M.E. & PLAXTON, W.C. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. **Plant Physiology**, 101:339-344, 1993.
- TOLLEY-HENRY, L.C. & RAPER, C.D., Jr. Nitrogen and dry matter partitioning in soybean plants during onset of and recovery from nitrogen stress. **Botanical Gazette**, 147:392-399, 1986a.

- TOLLEY-HENRY, L.C. & RAPER, C.D.; Jr. Expansion and photosynthetic rate of leaves of soybean plants during onset of and recovery from nitrogen stress. **Botanical Gazette**, 147:400-406, 1986b.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. **Manometric and biochemical techniques**, 5<sup>a</sup> ed. Burgess. Minneapolis, Minnesota. 387p, 1972.
- Van der WERF, A. & NAGEL, O. W. Carbon allocation to shoots and roots in relation to nitrogen supply is mediated by cytokinins and sucrose: Opinion. **Plant and Soil**, 185:21-32, 1996.
- Van KOOTEN, O. & SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, 25:147-150, 1990.
- VERHOEVEN, A.S.; DEMMIG-ADAMS, B. & ADAMS III, W.W. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. **Plant Physiology**, 113:817-824, 1997.
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. & MINFLIN, B.J. Distribution of the enzymes of nitrate assimilation within the pea leaf cell. **Plant Physiology**, 63:232-236. 1979.
- WANG, C.W. & TILLBERG, J.-E. Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzymes activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). **Physiologia Plantarum**, 97:339-345, 1996.
- WATANABE, M.; HAYASHI, M. & SUGIYAMA, T. Effects of supplemental nitrogen application on the activity of some nitrogen assimilation enzymes and leaf tissue productivity in maize seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, 31:573-580, 1985.
- WEATHEBURN, M.W. Phenol hypochloride reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, 39:971-974, 1967.

ZHANG, S.; HENNESSEY, T.C. & HEINEMANN, R.A. Acclimation of loblolly pine (*Pinus taeda*) foliage to light intensity as related to leaf nitrogen availability. **Canadian Journal of Forest Research**, 27:1032-1040, 1997.

ZORNOZA, P. & GONZALEZ, M. Intraspecific differences in nitrogen assimilating enzymes in spinach under contrasting forms of nitrogen supply. **Journal of Plant Nutrition**, 21:1129-1238, 1998.

---

---



