

LUCÍOLA ELLEN CALIÓ MARTINS

**ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DA UREIA POR PLANTAS DE
METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO C3 E C4**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M366a
2015

Martins, Lucíola Ellen Calió, 1985-
Absorção e assimilação da ureia por plantas de metabolismo
fotossintético C3 e C4 / Lucíola Ellen Calió Martins. – Viçosa,
MG, 2015.
vii, 34f : il. ; 29 cm.

Orientador: Reinaldo Bertola Cantarutti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fisiologia vegetal. 2. Plantas. 3. Metabolismo. 4. Ureia.
5. Fotossíntese. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Solos. Programa de Pós-graduação em Solos e
Nutrição de Plantas. II. Título.


CDD 22. ed. 581.1

LUCÍOLA ELLEN CALIÓ MARTINS

**ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DA UREIA POR PLANTAS DE
METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO C3 E C4**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 30 de junho de 2015.


Adelson Paulo de Araújo


Hermínia Emília Prieto Martínez


Maurício Paulo Ferreira Fontes


Wagner Luiz Araújo
(Coorientador)


Reinaldo Bertola Cantarutti
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade de realização do curso. À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e nos EUA. Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e pelo financiamento do projeto. Ao Departamento de Biologia Vegetal da UFV, pelo apoio fundamental no desenvolvimento do projeto. À University of Illinois at Urbana-Champaign, pela oportunidade de realização do estágio no exterior. A todas estas instituições, meus sinceros agradecimentos pela minha formação profissional e realização deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	04
CAPÍTULO 1 – METABOLISMO DA UREIA EM PLANTAS DE SOJA, MILHO E TRIGO.....	06
RESUMO	06
ABSTRACT	06
1. INTRODUÇÃO	07
2. MATERIAL E MÉTODOS	08
2.1. Período pré-experimental	08
2.2. Período experimental	08
2.3. Análises metabólicas	09
2.4. Análises estatísticas	10
3. RESULTADOS	10
4. DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS DE PLANTAS FORRAGEIRAS TROPICAIS À NUTRIÇÃO COM UREIA	18

RESUMO	18
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. Período pré-experimental	20
2.2. Período experimental	20
2.3. Análises metabólicas	21
2.4. Análises estatísticas	22
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CONSIDERAÇÕES GERAIS	34

RESUMO

MARTINS, Lucíola Ellen Calió, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2015. **Absorção e assimilação da ureia por plantas de metabolismo fotossintético C3 e C4.** Orientador: Reinaldo Bertola Cantarutti. Coorientadores: Ivo Ribeiro da Silva e Wagner L. Araújo.

Embora a ureia possa ser absorvida por certas espécies de plantas, sua eficiência de utilização se mostrou limitada e, frequentemente, tem-se reportado efeitos negativos no desenvolvimento das plantas nutridas com ureia em solução nutritiva. A assimilação da ureia difere entre as espécies porém, o suprimento de NO_3^- tem sido benéfico a este processo em todas as espécies investigadas. Para verificar as hipóteses de que as plantas de soja (*Glycine max* L.), milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Tanzânia são capazes de absorver e assimilar a ureia e que esta assimilação é diferente entre plantas de metabolismo C3 e C4 e aumentada pelo suprimento de NO_3^- , as espécies foram cultivadas em solução nutritiva contendo NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e em solução com ausência de N e aspectos fisiológicos e metabólicos foram investigados. A nutrição com ureia resultou em menor produção de matéria seca, alto conteúdo de aminoácidos, aminoaçúcares, açúcares e amido e redução da síntese de proteínas e clorofila, taxa de assimilação de CO_2 e condutância estomática das plantas. O suprimento de NA+U proporcionou o maior acúmulo de matéria seca das plantas, absorção e assimilação da ureia e atividade fotossintética. As espécies foram eficientes em absorvem a ureia e sua assimilação ocorreu nas raízes das plantas de milho, Marandu e Tanzânia e na parte

aérea das plantas de soja e trigo. As espécies C4 apresentaram maior eficiência de assimilação da ureia e a absorção e assimilação da ureia e a capacidade fotossintética das plantas foram beneficiadas pelo suprimento de NO_3^- .

ABSTRACT

MARTINS, Lucíola Ellen Calió, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **Urea uptake and assimilation by C3 and C4 plants.** Adviser: Reinaldo Bertola Cantarutti. Co-advisers: Ivo Ribeiro da Silva and Wagner L. Araújo.

Although urea can be uptaken by certain plant species, its use efficiency is limited and often has reported negative effects on the development of plants fed with urea in nutrient solution. Urea assimilation differs among species but NO_3^- supply has been beneficial to this process in all species investigated. In order to verify the hypothesis that soybean (*Glycine max* L.), corn (*Zea mays* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. Tanzânia can uptake and assimilate urea, and that urea assimilation is different between C3 and C4 plants and increased by NO_3^- supply, plants were grown in nutrient solution containing NH_4NO_3 (AN), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), AN+U, and in solution with N absence. Physiological and metabolic aspects were studied. Urea nutrition resulted in lower dry matter production, high content of amino acids, amino sugars, reducing sugars, and starch, and lower protein and chlorophyll synthesis, CO_2 assimilation rate, and stomatal conductance. The AN+U supply resulted in the highest dry matter production, urea uptake and assimilation, and photosynthetic activity. Soybean, corn, wheat, Marandu and Tanzânia were efficient in absorbing urea and its assimilation occurred in corn, Marandu and Tanzânia roots, and soybeans and wheat shoot. The C4 species had higher urea assimilation efficiency, and urea uptake and assimilation and photosynthetic capacity benefited by NO_3^- supply.

INTRODUÇÃO GERAL

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado no mundo e é também um metabólito derivado do catabolismo da arginina pela enzima arginase, oriundo da degradação de proteínas dentro das plantas. A ureia desempenha o papel de fonte de nitrogênio (N) absorvido pelas plantas da solução do solo e está envolvida na remobilização de N dos tecidos fonte das plantas.

Como fertilizante, a ureia é comumente aplicada no solo, onde sofre o processo de hidrólise, mediado pela enzima urease presente nos microrganismos do solo. A hidrólise da ureia gera carbamato e amônia (NH_3) e, na presença de água, de forma espontânea, o carbamato se transforma em CO_2 e a NH_3 em amônio (NH_4^+). Como resultado deste processo, tem-se, primeiramente, a disponibilização da forma amoniacal de N e de NH_4^+ , o qual, posteriormente, pode se transformar em nitrato (NO_3^-) pelo processo de nitrificação. Ambas as formas de N são requeridas e possuem suas funções específicas no desenvolvimento das plantas.

A arginina é uma proteína presente em altas concentrações em órgãos de reserva, como bulbos, tubérculos e raízes de árvores. É o metabólito mais importante de reserva de N nas sementes e a única fonte endógena de ureia das plantas. Após a germinação, a arginina é degradada nas mitocôndrias e seu catabolismo gera ornitina e ureia. A ureia é exportada para o citosol e, em seguida, hidrolisada pela urease e o NH_4^+ é reassimilado pela glutamina sintetase, utilizando o glutamato originado pelo catabolismo da ornitina como substrato. Todo o N da arginina é incorporado a glutamina, sendo a urease requerida para mobilizar metade do N da arginina.

As plantas possuem transportadores ativos de alta afinidade (DUR3) de ureia, envolvidos na absorção da ureia da solução do solo e no seu transporte interno. Esses transportadores são expressos na membrana plasmática das células da epiderme das raízes, especialmente em plantas deficientes em N, e são responsivos a ureia em condições de baixa disponibilidade de N. Internamente, os transportadores de ureia são expressos perto do xilema das raízes e na parte aérea. Adicionalmente, as plantas possuem transportadores passivos de baixa afinidade de ureia, mediados pelas aquaporinas e expressos no tonoplasto. A ureia armazenada nos vacúolos não está sujeita à hidrólise e assimilação (Kojima et al., 2007; Mérigout et al., 2008a).

Estudos têm demonstrado que as plantas supridas exclusivamente com ureia em solução nutritiva apresentam menor acúmulo de matéria seca e, alguns casos, sintomas de deficiência de N, embora sejam capazes de absorver a ureia de forma eficiente (Houdusse et al., 2005; Houdusse et al., 2007; Mérigout et al., 2008a; Mérigout et al., 2008b; Garnica et al., 2009; Guarnica et al., 2010a; Guarnica et al., 2010b; Cao et al., 2010). A baixa eficiência de assimilação da ureia tem sido mais relacionada à ausência de NO_3^- do que à absorção e hidrólise insuficientes e seu efeito negativo no desenvolvimento das plantas tem sido reportado em menor intensidade do que aquele associado à nutrição com NH_4^+ .

A influência do NO_3^- nos processos de assimilação de N e fotossíntese tem sido verificada com o suprimento de ureia juntamente com o NO_3^- (Houdusse et al., 2007; Mérigout et al., 2008a; Garnica et al., 2009; Guarnica et al., 2010b; Cao et al., 2010) e esta nutrição tem aumentando significativamente a eficiência de assimilação da ureia. Os efeitos positivos do NO_3^- na nutrição com ureia relacionam-se ao aumento da atividade da urease e da assimilação do NH_4^+ derivado da hidrólise da ureia pela ativação da enzima glutamina sintetase (Bradley et al., 1989; Houdusse et al., 2005; Garnica et al., 2009; Cao et al., 2010) e à indução da absorção de ureia (Mérigout et al., 2008a; Guarnica et al., 2010a). Adicionalmente, baixos teores de NO_3^- inibem a expressão dos genes envolvidos na fotossíntese, incluindo a síntese de clorofila e a degradação da proteína (Peng et al., 2007), bem como a expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinina (Miyawaki et al., 2004; Hirose et al., 2008; Garnica et al., 2010b), que pode estar relacionada à síntese de auxinas (Garnica et al., 2010b).

O acúmulo de aminoácidos em plantas nutridas unicamente com ureia frequentemente reportado está relacionado, provavelmente, ao acúmulo dos aminoácidos glutamina e asparagina, utilizados na translocação do N, ocasionando

reduções na assimilação de N em razão da inibição por *feedback* dos produtos de assimilação (glutamina e asparagina), que não são eficientemente translocados (Gerendás e Sattelmacher, 1999; Mérigout et al., 2008a; Wang et al., 2008; Cao et al., 2010; Guarnica et al., 2009; Guarnica et al., 2010a).

As plantas podem assimilar a ureia de maneiras distintas e esses processos podem estar associados ao metabolismo C3 e C4. Frequentemente, tem-se relatado maior eficiência de utilização da ureia em plantas de metabolismo C4 e sua assimilação tem ocorrido nas raízes dessas plantas (Arabidopsis em Mérigout et al., 2008a; milho em Mérigout et al., 2008b; arroz em Cao et al., 2010). Contrariamente, a assimilação da ureia em plantas C3 tem sido verificada predominantemente nas folhas (trigo em Guarnica et al., 2009 e em Guarnica et al., 2010a). Plantas de metabolismo C4 apresentam maior eficiência fotossintética de utilização de N, em razão da alta concentração de CO₂ nas células da bainha, a qual inibe a fotorrespiração e faz com que a enzima Rubisco funcione próximo da saturação. Dessa forma, a taxa de assimilação de CO₂ em espécies C4 pode ser mantida com apenas ¼ da concentração de Rubisco requerida nas espécies C3 (Friso et al., 2010).

Para verificar as hipóteses de que as plantas de soja (*Glycine max* L.), milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Tanzânia são capazes de absorver e assimilar a ureia e que esta assimilação é diferente entre plantas de metabolismo C3 e C4 e aumentada pelo suprimento de NO₃⁻ propôs-se o estudo a seguir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradeley, D.P.; Morgan, M.A. e O'Toole, P. Uptake and apparent utilization of urea and ammonium nitrate in wheat seedlings. *Fertilizer Research*, 20: 41–49, 1989.

Cao, F.Q.; Werner, A.K.; Dahncke, K.; et al. Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiology*, 154: 98–108, 2010.

Friso, G., Majeran, W., Huang, M. L.; et al. Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. *Plant Physiology*, 152: 1219-1250, 2010.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Yvin, J.C.; et al. Nitrate modifies urea root uptake and assimilation in wheat seedlings. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 89: 55–62, 2009.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A.M.; et al. Nitrate modifies the assimilation pattern of ammonium and urea in wheat seedlings. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 90: 357–369, 2010a.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A.M.; et al. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1264-1272, 2010b.

Gerendás, J.; Sattelmacher, B. Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. *giromontiina*). *Plant and Soil*, 196: 217–222, 1997.

Hirose, N.; Takey, K.; Kuroha, T.; et al. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* 59: 75–83, 2008.

Houdusse, F.; Zamarreno, A.M., Garnica, M.; et al. The importance of nitrate in ameliorating the effects of ammonium and urea nutrition on plant development: the relationships with free polyamines and plant proline contents. *Functional Plant Biology*, 32: 1057–1067, 2005.

V Houdusse, F.; Garnica, M.; Garcia-Mina, J.M. Nitrogen fertilizer source effects on the growth and mineral nutrition of pepper (*Capsicum annuum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of the Science Food and Agriculture*, 87:2099–2115, 2007.

Kojima, S.; Bohner, A.; von Wirén, N. Molecular mechanisms of urea transport in plants. *Journal of Membrane Biology*, 212: 83-91, 2007.

Mérigout, P; Gaudon, V.; Quilleré, I.; et al., Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 147: 1225–1238, 2008a.

Mérigout, P; Lelandais, F.; Bitton, F.; et al., Urea use efficiency of hydroponically grown maize and wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 31: 427–443, 2008b.

Miyawaki, K.; Matsumoto-Kitano, M.; Kakimoto, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37:128-138, 2004.

Peng, M.; Bi, Y.; Zhu, T.; et al. Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. *Plant Molecular Biology*, 65: 775–797, 2007.

Wang, W.H.; Kohler, B.; Cao, F.Q.; et al. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175: 467–477, 2008.

CAPÍTULO 1 - METABOLISMO DA UREIA EM PLANTAS DE SOJA, MILHO E TRIGO

RESUMO

A ureia pode ser absorvida e assimilada pelas plantas, embora sua eficiência de utilização seja menor do que a do NH_4^+ e NO_3^- , possivelmente, em decorrência da ausência de NO_3^- , e distinta entre plantas de metabolismo C3 e C4. Para verificar estas hipóteses, plantas de soja (*Glycine max* L.), milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) foram cultivadas em solução nutritiva contendo NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e em solução com ausência de N e aspectos metabólicos foram estudados. A nutrição exclusiva com ureia resultou em baixa produção de matéria seca e acúmulo de aminoácidos e aminoaçúcares em todas as espécies. O suprimento de NA+U resultou em maior acúmulo de matéria seca e conteúdo de ureia. A assimilação da ureia ocorreu na parte aérea das plantas de soja e trigo e nas raízes das plantas milho, as quais apresentaram maior eficiência de utilização de ureia. As espécies C3 apresentaram menor eficiência de assimilação de ureia em relação ao milho e este processo foi beneficiado pelo suprimento de NO_3^- independentemente do metabolismo C3/C4.

Palavras-chaves: absorção de ureia, assimilação de ureia, eficiência de utilização, aminoácidos, aminoaçúcares, NO_3^- .

ABSTRACT

Urea can be uptaken and assimilated by plants, although its use efficiency is lower than NH_4^+ and NO_3^- use efficiency, possibly due to the absence of NO_3^- , and different between C3 and C4 plants. In order to verify these hypothesis, soybean (*Glycine max* L.), corn (*Zea mays* L.), and wheat (*Triticum aestivum* L.) plants were grown in nutrient solution containing NH_4NO_3 (AN), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), AN+U, and in solution with N absence. Metabolic aspects were studied. The sole nutrition with urea resulted in low dry matter production and high content of amino acids and amino sugars in all species. The AN+U supply showed the highest dry matter production and urea content. Urea assimilation occurred in soybean and wheat shoot and corn roots, which showed higher urea use efficiency. The C3 species had lower urea assimilation efficiency compared to corn and this process has benefited by NO_3^- supply regardless of the C3/C4 metabolism.

Keywords: urea uptake, urea assimilation, utilization efficiency, amino acids, amino sugars, NO_3^- .

1. INTRODUÇÃO

A ureia é intensivamente utilizada como fertilizante nitrogenado e, em solos, proporciona imediata disponibilidade de NH_4^+ , por meio da hidrólise catalisada pela enzima urease, e de NO_3^- , pela subsequente nitrificação. Em solução nutritiva, onde a hidrólise é limitada pela ausência de microrganismos, plantas de *Arabidopsis* (Mérigout et al., 2008a), milho (Mérigout et al., 2008b), trigo (Mérigout et al., 2008b; Guarnica et al., 2009) e arroz (Cao et al., 2010) se mostraram menos eficientes em assimilar a ureia do que NH_4^+ e NO_3^- . Nestas condições, as plantas supridas apenas com ureia apresentaram menor crescimento e, em alguns casos, sintomas de deficiência de N.

O aumento da eficiência de assimilação da ureia tem sido reportado na presença de NO_3^- e o efeito benéfico desta forma de N tem sido relacionado ao aumento da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da ureia (Houdusse et al., 2005; Houdusse et al., 2007; Mérigout et al., 2008a; Garnica et al., 2009; Guarnica et al., 2010b; Cao et al., 2010).

A assimilação de ureia pelas plantas foi reportada de maneira distinta entre as espécies estudadas. Estudos relataram maior eficiência de utilização da ureia em plantas de metabolismo C4 e sua assimilação ocorreu nas raízes dessas plantas (Mérigout et al., 2008a; Mérigout et al., 2008b). Contrariamente, a assimilação da ureia em plantas C3 foi verificada predominantemente nas folhas (Mérigout et al., 2008b). A eficiência de utilização de N é maior em plantas C4, uma vez que menor quantidade da enzima Rubisco é requerida para a assimilação de CO_2 em plantas C4 do que em plantas C3. A maior taxa fotossintética por unidade de N resulta em maiores taxas de desenvolvimento e de expansão foliar em gramíneas C4 do que em gramíneas C3 e dicotiledôneas (Sage et al., 1987).

Para verificar a hipótese de que as plantas de soja, milho e trigo são capazes de absorver e assimilar a ureia e seu metabolismo é beneficiado pela presença de NO_3^- e difere entre as plantas de metabolismo C3 e C4, aspectos metabólicos foram investigados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de soja (*Glycine max* L.), milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) foram cultivadas em solução nutritiva para minimizar a hidrólise da ureia, em casa de vegetação, com temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas e 80% de umidade relativa, na University of Illinois at Urbana-Champaign, EUA.

2.1. Período pré-experimental

Utilizaram-se plântulas germinadas em leito de areia esterilizada e transferidas para vasos com solução nutritiva 15 dias após a germinação. Durante o período pré-experimental de 10 dias, a solução nutritiva continha 4,0, 0,2, 3,2, 4,0, 1,0 e 2,4 mmol/L de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente e 2,0, 1,0, 1,0, 0,4, 0,02 e 200 µmol/L de B, Mn, Zn, Cu, Mo e Fe-EDTA, respectivamente (De Bona et al., 2011), sendo renovada a cada dois dias. O N foi suprido na forma de NH₄NO₃. Nos primeiros quatro dias, a solução nutritiva possuía a metade dessas concentrações. O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente, sendo mantido em 5,5 - 6,0.

2.2. Período experimental

No período experimental de 21 dias as plantas foram mantidas em solução nutritiva contendo 4 mmol/L de N supridos na forma de NH₄NO₃ (NA), CO(NH₂)₂ (U), NA+U (1 mmol/L de NH₄NO₃ + 1 mmol/L de CO(NH₂)₂) ou em solução com ausência de N. Cada unidade experimental foi composta de três vasos, contendo uma planta e 1 L de solução nutritiva por vaso. As soluções foram renovadas a cada dois dias, com pH ajustado para 5,5 – 6,0. Para monitorar possíveis alterações na concentração de ureia, oriundas do processo de hidrólise, foram mantidos quatro vasos contendo ureia como única fonte de N, sem a presença de plantas. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados, com quatro repetições.

Ao final do período experimental, foram obtidas amostras compostas de segmentos de 2 cm de lâmina foliar do terço médio de duas folhas recém-expandidas. As raízes foram lavadas em água ultrapura para a obtenção das amostras, compostas pelo terço médio do comprimento de todas as raízes. O material vegetal foi mantido em nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* (-80 °C). Foram coletadas alíquotas das

soluções nutritivas para quantificar as concentrações de ureia, NH_4^+ e NO_3^- , obtidas de acordo com os métodos utilizados para a avaliação do material vegetal.

2.3. Análises metabólicas

Para determinar o teor de ureia e de NO_3^- , a 1,5 g e 0,75 g do tecido vegetal fresco, finamente moído, respectivamente, adicionou-se 15 mL de ácido fórmico 10 mmol/L (< 2 °C) e o extrato foi obtido por centrifugação (ureia: 22 000 g a 4 °C por 15 min; NO_3^- : 20 000 g a 4 °C por 5 min). A ureia foi determinada de acordo com o método de difusão enzimática, descrito por Marsh et al. (2004). Para isso, em recipiente de vidro com 10 mL do extrato adicionou-se 1 mL de água deionizada, contendo 50 mg de urease, e 50 mg de MgO. O recipiente foi agitado, fechado hermeticamente, mantendo em seu interior uma placa de petri com 5 mL de H_3BO_3 e, em seguida, foi aquecido a 50 °C por 105 min. Na sequência, removeu-se a placa de petri com solução de H_3BO_3 e o N proveniente da (ureia + NH_4^+) foi quantificado por titulação com H_2SO_4 0,01 mol/L. A ureia foi estimada subtraindo-se o teor de NH_4^+ obtido em outra amostra. O NH_4^+ e o NO_3^- foram determinados segundo o método descrito por Khan et al. (2000). Em recipiente de vidro com 10 mL do extrato, adicionou-se 1 mL de ácido salicílico, seguido de 20 mg de MgO e 20 mg de liga de Devarda. O recipiente foi agitado, fechado hermeticamente, mantendo em seu interior uma placa de petri com 5 mL de H_3BO_3 e, em seguida, aquecido a 50 °C, por 2 h. Após a remoção da placa de petri, a solução de H_3BO_3 foi titulada com H_2SO_4 0,01 mol/L determinando-se o N proveniente do (NH_4^+ + NO_3^-). Para a determinação do NH_4^+ , seguiu-se o mesmo procedimento adicionando-se apenas 20 mg de MgO. O teor de NO_3^- foi estimado por diferença.

Para determinar os teores de NH_4^+ , aminoácidos e aminoaçúcares, 0,75 g do tecido vegetal fresco, finamente moído, foi submetido a extração etanólica em duas etapas (etanol 980 mL/L e 800 mL/L). Na determinação do NH_4^+ , em recipiente de vidro com 10 mL do extrato, adicionou-se 20 mg de MgO. O recipiente foi agitado e fechado hermeticamente, contendo uma placa de petri com 5 mL de H_3BO_3 em seu interior e, em seguida, aquecido a 50 °C, por 2 h. Em seguida, removeu-se a placa de petri e a solução de H_3BO_3 foi titulada com H_2SO_4 0,01 mol/L, determinando-se o N proveniente do NH_4^+ . Para quantificar o teor de aminoácidos, a 10 mL do extrato adicionou-se 1 mL de ninidrina e, em seguida, o recipiente de vidro foi aquecido a 100 °C, por 90 min. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de NaOH 10 mol/L e o recipiente, contendo uma placa de petri com 5 mL de H_3BO_3 foi fechado e aquecido novamente a

50 °C, por 2 h. Posteriormente, pela titulação com H₂SO₄ 0,001 mol/L, determinou-se o N proveniente dos aminoácidos. Para determinar o teor de aminoaçúcares, em recipiente de vidro com 10 mL do extrato adicionou-se 2 mL de NaOH 10 mol/L. O recipiente foi fechado hermeticamente com tampa contendo um disco de petri com 5 mL de H₃BO₃ e aquecido a 50 °C, por 5 h. O teor de aminoaçúcares foi determinado por titulometria com H₂SO₄ 0,001 mol/L.

2.4. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação múltipla de médias de Tukey, admitindo-se significância ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico *Statistical Analysis System*.

3. RESULTADOS

A ausência de NH₄⁺ e de NO₃⁻ na solução nutritiva com ureia e sem o cultivo de plantas evidenciou a estabilidade da ureia em solução (Tabela 1), indicando que os processos de hidrólise e nitrificação foram limitados. Assim, a menor concentração de ureia nas soluções nutritivas com as plantas sugere a absorção da ureia pela soja, milho e trigo. As concentrações de ureia das soluções contendo apenas esta fonte de N evidenciaram a absorção de 2,91, 3,78 e 3,32 mmol de ureia pelas plantas de soja, milho e trigo, respectivamente (Tabela 1). As concentrações de NH₄⁺ e de NO₃⁻ na solução nutritiva contendo NH₄NO₃ (NA) e NH₄NO₃ + CO(NH₂)₂ (NA+U) indicaram que as plantas absorveram mais NO₃⁻ do que NH₄⁺ e a nutrição com NA+U resultou em maior absorção destas formas de N (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração (mmol/L) de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4^+ e NO_3^- na solução nutritiva contendo NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e sem N (-N), após 21 d de crescimento das plantas de soja, milho e trigo e sem o cultivo de plantas

Espécies	Fonte de N	Concentração (mmol/L)		
		$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	NH_4^+	NO_3^-
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	NA	nd	1,22	0,67
	U	1,72	0,28	0,08
	NA + U	0,84	0,75	0,38
	-N	nd	nd	nd
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	NA	nd	1,50	0,81
	U	0,85	0,32	0,22
	NA + U	0,80	1,12	0,52
	-N	nd	nd	nd
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	NA	nd	1,68	1,03
	U	1,31	0,17	0,08
	NA + U	0,92	0,78	0,42
	-N	nd	nd	nd
Sem planta	U	4,63	nd	nd

nd = não detectado

As plantas cultivadas exclusivamente com ureia apresentaram menor acúmulo de matéria seca da parte aérea e da planta (Figura 1). Contudo, em todas as espécies, a maior produção de matéria seca foi obtida pelas plantas supridas com NA+U. O acúmulo de matéria seca das raízes das plantas nutridas unicamente com ureia foi maior do que o daquelas supridas com as demais fontes de N e, adicionalmente aos sintomas visuais, indicou deficiência de N.

A variação no crescimento das plantas de acordo com a fonte de N relaciona-se com o teor de N. As plantas supridas com ureia apresentaram menores teores e conteúdo de N do que aquelas supridas com as outras fontes de N (Figura 1). O maior conteúdo de N foi observado no suprimento de NA+U em todas as espécies, apontando efeito benéfico do suprimento conjunto de formas orgânicas e inorgânicas de N. O coeficiente de utilização biológica ($\text{CUB} = 1/\text{teor de N}$) das plantas de soja, milho e trigo nutridas apenas com ureia foram de 22,82, 27,09 e 18,27 mg/mg, respectivamente, indicando que as espécies C3 apresentaram menor eficiência de assimilação de ureia do que o milho, sendo o trigo a espécie de menor eficiência de assimilação de ureia.

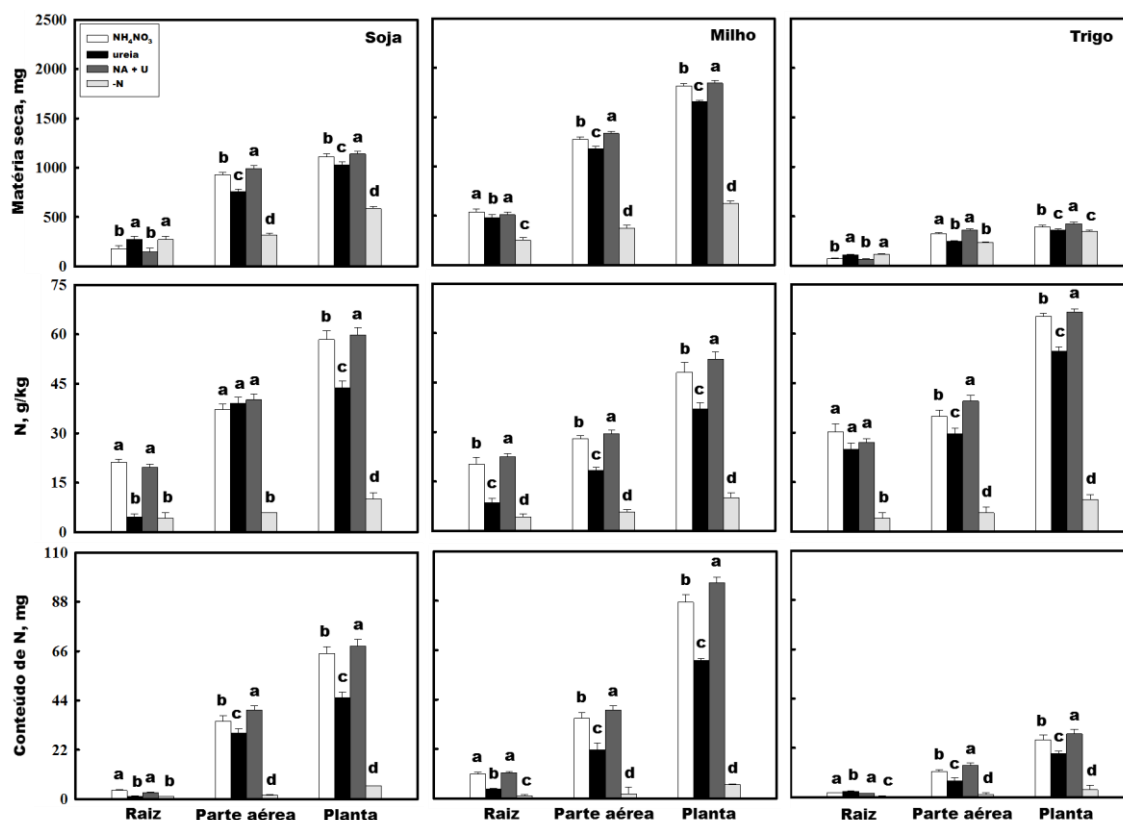


Figura 1 - Produção de matéria seca da raiz, parte aérea e planta, teor e conteúdo de N na raiz, parte aérea e planta, após 21 d de crescimento das plantas de soja, milho e trigo, em resposta ao suprimento de N na forma de NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, $P < 0,05$)

Os maiores teores (Figura 2) de ureia foram obtidos na parte aérea das plantas de soja e trigo e nas raízes das plantas de milho supridas com NA+U. O conteúdo de ureia (Tabela 2) foi maior nas plantas nutridas com NA+U em todas as espécies. Os maiores teores de NH_4^+ foram observados na parte aérea da soja e do trigo e nas raízes do milho cultivados apenas com ureia (Figura 2). Contudo, o conteúdo (Tabela 2) desta forma de N não diferiu estatisticamente entre as fontes de N. As três espécies apresentaram teores (Figura 2) e conteúdo (Tabela 2) muito baixos de NO_3^- na parte aérea e nas raízes das plantas nutridas exclusivamente com ureia. Os maiores teores desta forma de N na parte aérea e nas raízes foram obtidos com o suprimento de NA e de NA+U na soja e no trigo e com o suprimento de NA+U no milho (Figura 2) e seu maior conteúdo foi verificado na parte aérea e nas raízes das espécies cultivadas com NA+U.

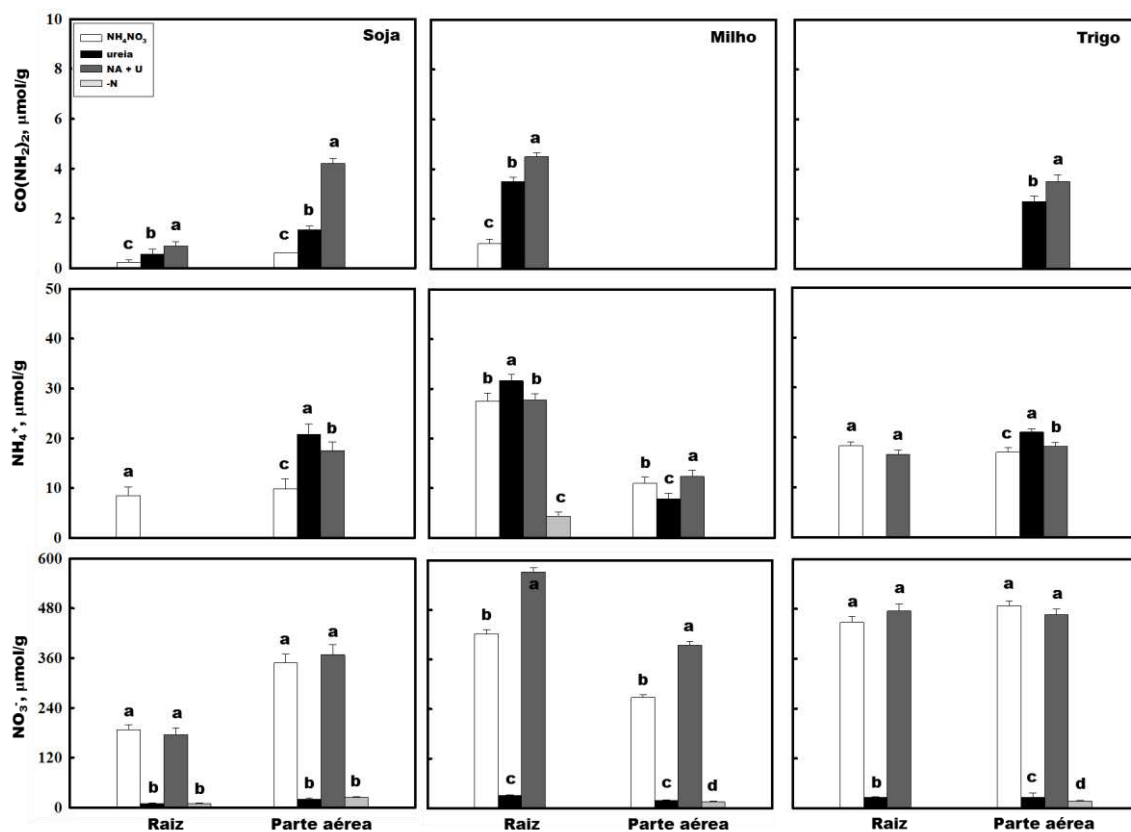


Figura 2 – Teor de CO(NH₂)₂, NH₄⁺ e NO₃⁻ na raiz e parte aérea, após 21 d de crescimento das plantas de soja, milho e trigo, em resposta ao suprimento de N na forma de NH₄NO₃ (NA), CO(NH₂)₂ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, *P*<0,05)

As plantas de soja e trigo supridas com ureia apresentaram maiores teores de aminoácidos na parte aérea do que nas raízes (Figura 3). As plantas de milho, diferentemente, apresentaram maiores teores de aminoácidos nas raízes do que na parte aérea (Figura 3). Todas as espécies apresentaram maior conteúdo de aminoácidos quando cultivadas exclusivamente com ureia (Tabela 2). Os teores (Figura 3) e o conteúdo (Tabela 2) de aminoaçúcares foram maiores nas plantas supridas unicamente com ureia do que naquelas supridas com as demais fontes de N e estatisticamente iguais ao cultivo sem o suprimento de N.

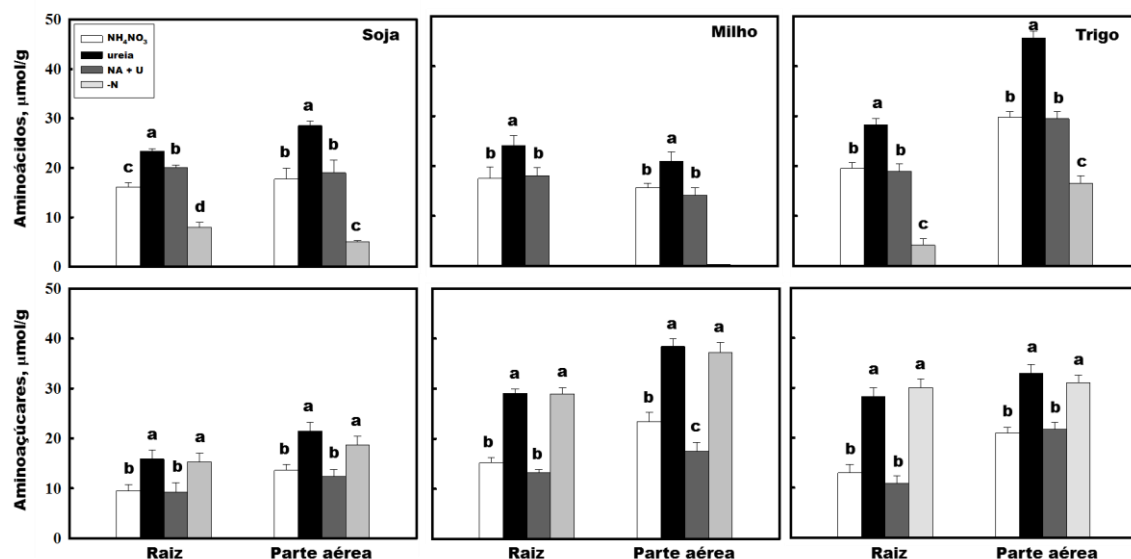


Figura 3 - Teor de aminoácidos e aminoaçúcares na raiz e parte aérea, após 21 d de crescimento das plantas de soja, milho e trigo, em resposta ao suprimento de N na forma de NH₄NO₃ (NA), CO(NH₂)₂ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, $P < 0,05$)

Tabela 2. Conteúdo (mg) de CO(NH₂)₂, NH₄⁺, NO₃⁻, aminoácidos e aminoaçúcares das plantas de soja, milho e trigo supridas com NH₄NO₃ (NA), CO(NH₂)₂ (U), NA+U e sem N (-N), após 21 d de crescimento

Espécies	Fonte de N	CO(NH ₂) ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Conteúdo (μmol)	
					Aminoácidos	Aminoaçúcares
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	NA	0,92 ± 0,03 c	20,30 ± 2,7 a	594,85 ± 7,4 b	43,16 ± 1,2 b	25,70 ± 1,7 b
	U	2,14 ± 0,02 b	21,36 ± 2,1 a	30,14 ± 3,3 c	53,43 ± 1,6 a	38,48 ± 2,4a
	NA+U	5,81 ± 0,05 a	19,96 ± 1,9 a	619,25 ± 6,7 a	44,55 ± 1,1 b	24,62 ± 1,2 b
	-N	nd	nd	19,21 ± 1,1 d	7,61 ± 0,6 c	19,88 ± 0,8 c
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	NA	1,82 ± 0,02 c	69,92 ± 3,2 a	1253,95 ± 28,2 b	60,33 ± 2,1 b	70,15 ± 3,7 b
	U	5,73 ± 0,02 b	65,55 ± 4,7 a	83,66 ± 13,0 c	74,62 ± 1,3 a	112,85 ± 5,5 a
	NA+U	7,84 ± 0,06 a	73,89 ± 4,1 a	1782,82 ± 32,6 a	59,46 ± 1,9 b	56,73 ± 3,9 c
	-N	nd	2,74 ± 1,2 b	9,99 ± 0,9 d	0,17 ± 0,0 c	41,55 ± 2,4 d
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	NA	nd	13,94 ± 2,1 a	368,51 ± 12,2 b	19,40 ± 0,8 b	13,34 ± 0,9 b
	U	0,96 ± 0,04 b	11,43 ± 2,3 a	18,56 ± 2,3 c	26,35 ± 0,8 a	21,82 ± 0,7 a
	NA+U	1,49 ± 0,04 a	14,78 ± 1,7 a	400,48 ± 8,1 a	20,58 ± 1,1 b	13,81 ± 1,1 b
	-N	nd	nd	5,90 ± 0,8 d	7,18 ± 0,5 c	21,18 ± 0,9 a

Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente a 5 % pelo teste de Tukey
nd = não detectado

4. DISCUSSÃO

O menor acúmulo de matéria seca (Figura 1) e os sintomas visuais de deficiência de N das plantas nutridas com ureia parece estar mais relacionado à nutrição insuficiente de NO_3^- (Figura 2), que limitou a assimilação da ureia (Figura 3), do que à absorção ineficiente de ureia pelas plantas e estes resultados foram também reportados por Gerendás e Sattelmacher (1997), Mérigout et al. (2008a), Mérigout et al. (2008b), Wang et al. (2008), Guarnica et al. (2009), Guarnica et al. (2010a) e Cao et al. (2010). Os teores de N das plantas supridas com ureia (Figura 1) foram superiores ao teor médio adequado de 30 e 40 g/kg de N para a produção de milho e trigo e de soja, respectivamente, indicando que a absorção de ureia supriu a demanda de N das plantas.

O efeito benéfico do NO_3^- , possivelmente, está relacionado ao aumento da atividade da urease e da assimilação do NH_4^+ derivado da hidrólise da ureia pela ativação da enzima glutamina sintetase (Bradley et al., 1989; Houdusse et al., 2005; Guarnica et al., 2009; Cao et al., 2010) e à indução da absorção de ureia (Mérigout et al., 2008a).

Os maiores teores (Figura 2) de aminoácidos nas folhas do que nas raízes das plantas de soja e trigo sugerem que a assimilação da ureia ocorreu predominantemente nas folhas, resultados também constatados por Cao et al. (2010) e Guarnica et al. (2010a). Contrariamente, os maiores teores de aminoácidos nas raízes do que nas folhas das plantas de milho indicam que a assimilação da ureia ocorreu predominante nas raízes e estes resultados foram também relatados por Mérigout et al. (2008b) e em plantas de *Arabidopsis* (Mérigout et al., 2008a). O acúmulo de aminoácidos (Figura 3 e Tabela 2) nas plantas nutridas unicamente com ureia está relacionado, provavelmente, ao acúmulo dos aminoácidos glutamina e asparagina, utilizados na translocação do N, ocasionando reduções na assimilação de N em razão da inibição por feedback dos produtos de assimilação (glutamina e asparagina), que não são eficientemente translocados (Gerendás e Sattelmacher, 1999; Mérigout et al., 2008a; Wang et al., 2008; Cao et al., 2010; Guarnica et al., 2009; Guarnica et al., 2010a).

Plantas de metabolismo C4 apresentam maior eficiência fotossintética de utilização de N, em razão da alta concentração de CO_2 nas células da bainha, a qual inibe a fotorrespiração e faz com que a enzima Rubisco funcione próximo da saturação. Dessa forma, a taxa de assimilação de CO_2 em espécies C4 pode ser mantida com apenas $\frac{1}{4}$ da concentração de Rubisco requerida nas espécies C3 (Friso et al., 2010). De fato, as plantas de milho apresentaram maior eficiência de utilização da ureia, seguidas

pelas plantas de soja e trigo, e também mostraram maior capacidade de absorção da ureia. Apesar de ser uma planta de metabolismo C3, a soja apresentou maior eficiência de utilização da ureia e tal constatação pode estar relacionada a presença de dois genes codificadores da enzima urease (Witte, 2011), enquanto que as demais espécies possuem apenas um.

5. CONCLUSÕES

As plantas de soja, milho e trigo cultivadas em solução nutritiva foram capazes de absorver e assimilar a ureia. A assimilação da ureia ocorreu de maneira distinta entre as espécies, sendo preferencialmente assimilada nas folhas de soja e trigo e nas raízes de milho. As plantas de milho apresentaram maior eficiência de utilização da ureia e esta constatação está relacionada ao metabolismo C3/C4. O menor acúmulo de matéria seca observado nas plantas nutridas exclusivamente com ureia pode estar relacionado ao suprimento insuficiente de NO_3^- , que parece ter limitado a assimilação de N.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradeley, D.P.; Morgan, M.A. e O'Toole, P. Uptake and apparent utilization of urea and ammonium nitrate in wheat seedlings. *Fertilizer Research*, 20: 41–49, 1989.

Cao, F.Q.; Werner, A.K.; Dahncke, K.; et al. Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiology*, 154: 98–108, 2010.

De Bona, F. D., Fedoseyenco, D., Wirén, N., Monteiro, F. A. Nitrogen utilization by sulfur-deficient barley plants depends on the nitrogen form. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 237-244, 2011.

Friso, G., Majeran, W., Huang, M. L.; et al. Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. *Plant Physiology*, 152: 1219-1250, 2010.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Yvin, J.C.; et al. Nitrate modifies urea root uptake and assimilation in wheat seedlings. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 89: 55–62, 2009.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A.M.; et al. Nitrate modifies the assimilation pattern of ammonium and urea in wheat seedlings. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 90: 357–369, 2010a.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A.M.; et al. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1264-1272, 2010b.

Gerendás, J.; Sattelmacher, B. Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. giromontiina). *Plant and Soil*, 196: 217–222, 1997.

Hirose, N.; Takey, K.; Kuroha, T.; et al. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* 59: 75–83, 2008.

Houdusse, F.; Zamarreno, A.M., Garnica, M.; et al. The importance of nitrate in ameliorating the effects of ammonium and urea nutrition on plant development: the relationships with free polyamines and plant proline contents. *Functional Plant Biology*, 32: 1057–1067, 2005.

Khan, S.A.; Mulvaney, R.L.; Hoelt, R.G. Direct-diffusion methods for inorganic-nitrogen analysis of soil. *Soil Science Society of America Journal*, 64:1083-1089, 2000.

Marsh, K.L.; Mulvaney, R.L.; Khan, S.A. Use of diffusion for enzymatic determination of urea-nitrogen in soil extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35: 691-702, 2004.

Mérigout, P; Gaudon, V.; Quilleré, I.; et al., Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 147: 1225–1238, 2008a.

Mérigout, P; Lelandais, F.; Bitton, F.; et al., Urea use efficiency of hydroponically grown maize and wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 31: 427–443, 2008b.

Miyawaki, K.; Matsumoto-Kitano, M.; Kakimoto, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37:128-138, 2004.

Peng, M.; Bi, Y.; Zhu, T.; et al. Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. *Plant Molecular Biology*, 65: 775–797, 2007.

Rolland, F.; Baena-Gonzales, E.; Sheen, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 675–709, 2006.

Sage, R.F; Percy, R.W.; Seeman, J.R. The nitrogenase efficiency of C3 and C4 plants. III. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiology*, 85: 355-359, 1987.

Wang, W.H.; Kohler, B.; Cao, F.Q.; et al. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175: 467–477, 2008.

Witte, C. P. Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180: 431-438, 2011.

CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS DE PLANTAS FORRAGEIRAS TROPICAIS À NUTRIÇÃO COM UREIA

RESUMO

Certas espécies podem absorver e assimilar a ureia e a nutrição com esta forma de N pode causar efeitos negativos no desenvolvimento das plantas. Alguns autores sugerem que o NO_3^- pode modificar a absorção e a assimilação de ureia. Para verificar estas hipóteses, plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Tanzânia foram cultivadas em solução nutritiva contendo NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e em solução com ausência de N e aspectos fisiológicos e metabólicos foram estudados. Os resultados indicaram que a ureia foi absorvida e assimilada pelas raízes das plantas e seu suprimento exclusivo resultou em menor acúmulo de matéria seca, acúmulo de aminoácidos, açúcares e amido e redução da síntese de proteínas e clorofila, taxa de assimilação de CO_2 e condutância estomática. O suprimento de NA+U proporcionou a maior produção de matéria seca das plantas e resultou em aumento da absorção e assimilação da ureia e da atividade fotossintética. As plantas de Marandu e Tanzânia foram eficientes em absorvem ureia e sua assimilação e capacidade fotossintética foram beneficiadas pelo suprimento de NO_3^- .

Palavras-chaves: absorção de ureia, assimilação de ureia, NO_3^- , clorofila, assimilação de CO_2 , aminoácidos, proteína, açúcares, amido.

ABSTRACT

Certain plant species can uptake and assimilate urea and urea nutrition can cause negative effects on plant development. Some authors suggest that NO_3^- can modify urea uptake and assimilation. In order to verify these hypotheses, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Panicum maximum* cv. Tanzânia plants were grown in nutrient solution containing NH_4NO_3 (AN), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), AN+U, and in solution with N absence. Physiological and metabolic aspects were studied. Results indicated that urea was uptake and assimilated by plant roots and its sole supply resulted in lower dry matter, high content of amino acids, reducing sugars and starch, and lower protein and chlorophyll synthesis, CO_2 assimilation rate, and stomatal conductance. The AN+U supply provided the highest dry matter plant production, uptake and assimilation of urea

and photosynthetic activity. Marandu and Tanzânia plants were efficient in absorbing urea and its assimilation and photosynthetic capacity benefited by the NO_3^- supply.

Keywords: urea uptake, urea assimilation, NO_3^- , chlorophyll, CO_2 assimilation, amino acids, protein, sugars, starch.

1. INTRODUÇÃO

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado na agricultura, representando mais da metade do N aplicado para a produção agrícola mundial. No solo, a ureia é hidrolisada pela enzima urease, produzida por microrganismos, em NH_4^+ , ficando este íon sujeito à nitrificação. Assim, a fertilização com ureia disponibiliza simultaneamente para as plantas $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4^+ e NO_3^- por, pelo menos, curtos períodos de tempo.

Estudos demonstraram que plantas de *Arabidopsis* (Mérigout et al., 2008a), milho (Mérigout et al., 2008b), trigo (Mérigout et al., 2008b; Guarnica et al., 2009, Guarnica et al., 2010a), pimenta (Guarnica et al., 2009) e arroz (Cao et al., 2010), quando cultivadas em solução nutritiva (condição em que a reação de hidrólise é limitada pela ausência de microrganismos), foram capazes de absorver a ureia e hidrolisá-la de forma eficiente. No entanto, o suprimento exclusivo de ureia como fonte de N resultou em menor crescimento das plantas e, em alguns casos, sintomas de deficiência de N, indicando que sua eficiência de assimilação foi inferior a de NH_4^+ e NO_3^- .

A baixa eficiência de assimilação da ureia tem sido mais relacionada à ausência de NO_3^- do que à absorção e hidrólise insuficientes e seu efeito negativo no desenvolvimento das plantas tem sido reportado em menor intensidade do que aquele associado à nutrição com NH_4^+ (Houdusse et al., 2005; Houdusse et al., 2007). Em decorrência da influência do NO_3^- nos processos de assimilação de N e fotossíntese, o suprimento de ureia juntamente com o NO_3^- promoveu maior acúmulo de matéria seca nas plantas (Houdusse et al., 2007; Mérigout et al., 2008a; Garnica et al., 2009; Guarnica et al., 2010b; Cao et al., 2010), aumentando significativamente a eficiência de assimilação da ureia.

Para verificar a hipótese de que as plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Tanzânia são capazes de absorver e assimilar a ureia e seu metabolismo é beneficiado pela presença de NO_3^- , aspectos fisiológicos e metabólicos foram investigados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as espécies *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Panicum maximum* cv. Tanzânia, cultivadas em solução nutritiva para minimizar a hidrólise da ureia. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento climatizada, com temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas, 80% de umidade relativa e iluminação de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

2.1. Período pré-experimental

Utilizaram-se plântulas germinadas em leito de areia esterilizada e transferidas para vasos com solução nutritiva 10 dias após a germinação. Durante o período pré-experimental de 10 dias, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva contendo 4,0, 0,2, 3,2, 4,0, 1,0 e 2,4 mmol/L de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente e 2,0, 1,0, 1,0, 0,4, 0,02 e 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ de B, Mn, Zn, Cu, Mo e Fe-EDTA, respectivamente (De Bona et al., 2011), renovada a cada dois dias. O N foi suprido na forma de NH_4NO_3 . Nos primeiros quatro dias, a solução nutritiva possuía a metade dessas concentrações. O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente, sendo mantido em 5,5-6,0. Esse procedimento permitiu isentar os resultados de possíveis efeitos oriundos da alteração do pH devido à adubação nitrogenada.

2.2. Período experimental

Para o período experimental de 21 dias, as plantas foram mantidas em solução nutritiva contendo 4 mmol/L de N supridos na forma de NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U (1 mmol/L de NH_4NO_3 + 1 mmol/L de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) e em solução com ausência de N. Cada unidade experimental foi composta de três vasos contendo 1 L de solução nutritiva e uma planta por vaso. As soluções foram renovadas a cada dois dias, com pH ajustado para 5,5 – 6,0. Para monitorar possíveis alterações na concentração de ureia, oriundas do processo de hidrólise, foram mantidos quatro vasos contendo a solução nutritiva completa com ureia, sem o cultivo de plantas. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados, com quatro repetições.

Ao final do período experimental, determinou-se a taxa de assimilação líquida de carbono (A , $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ CO_2), condutância estomática (g_s , $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ H_2O) e concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol}/\text{mol}$ CO_2), utilizando-se o medidor de

fotossíntese portátil, modelo LI-6400, com intensidade de luz na câmara foliar de 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e concentração média de CO_2 de 350 $\mu\text{mol}/\text{mol}$. Foram obtidas amostras compostas de segmentos de 2 cm de lâmina foliar do terço médio de duas folhas recém-expandidas. As raízes foram lavadas em água ultrapura para a obtenção das amostras, compostas pelo terço médio do comprimento de todas as raízes. O material vegetal foi mantido em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (-80 °C). Foram coletadas alíquotas das soluções nutritivas para quantificar as concentrações de ureia, NH_4^+ e NO_3^- , obtidas de acordo com os métodos utilizados para a avaliação do material vegetal.

2.3. Análises metabólicas

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl. Para determinar o teor de ureia e de NO_3^- , a 100 mg e a 50 mg do tecido vegetal fresco finamente moído, respectivamente, adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 10 mmol/L (< 2 °C) e o extrato foi obtido por centrifugação (ureia: 22 000 g a 4 °C por 15 min; NO_3^- : 20 000 g a 4 °C por 5 min). A ureia foi determinada de acordo com método descrito por Mérigout et al. (2008a). Para isto, a 30 μL do extrato, adicionou-se 1 mL da solução ácida (200 mL/L de H_2SO_4 e 0,6 mL/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 74 mmol/L em solução 90 mL/L de H_3PO_4), 1 mL da solução para o desenvolvimento de coloração (70 mL/L de diacetilmonoxima 0,2 mol/L e 70 mL/L de tiosemicarbazida 0,05 mol/L) e 1 mL de água ultrapura. As amostras foram incubadas por 15 min a 99 °C e esfriadas por 5 min no gelo, anteriormente a quantificação por espectrofotometria de absorção molecular (540 nm). O NO_3^- foi determinado segundo o método descrito por De Bona et al. (2011), adicionando-se a 80 μL do extrato, 160 μL de solução 10 g/L de ácido salicílico dissolvido em H_2SO_4 e 160 μL de água ultrapura. Esta mistura permaneceu em repouso por 20 min no gelo e, posteriormente, adicionou-se 1,8 mL de solução de NaOH 4 mol/L resfriada (< 2 °C). O NO_3^- foi quantificado por espectrofotometria de absorção molecular (410 nm).

Para determinar os teores de NH_4^+ , clorofila, aminoácidos, glicose, frutose e sacarose, proteína e amido, 50 mg do tecido vegetal fresco finamente moído, foram submetidos a extração etanólica em duas etapas (etanol 980 mL/L e 800 mL/L). O NH_4^+ foi determinado pelo método colorimétrico fenol hipoclorito (reação de Berthelot), por espectrofotometria de absorção molecular (625 nm), de acordo com Weatherburn (1967). O teor de clorofila foi obtido pela leitura de 50 μL do extrato etanólico em comprimentos de onda de 645 nm e 665 nm. Para quantificar o teor de aminoácidos, a

50 µL do extrato etanólico, adicionou-se 50 µL do tampão citrato/NaOH 1 mol/L (pH 5,2) com ácido ascórbico 20 g/L e 100 µL de solução de 10 g/L de ninidrina em solução 700 mL/L de etanol. As amostras foram aquecidas a 95 °C por 20 min e agitadas (10 000 g por 10 s) e, posteriormente, a determinação se deu por espectrofotometria de absorção molecular (550 nm). Para quantificação dos açúcares, a 50 µL do extrato etanólico, adicionou-se 160 µL de mistura das soluções: 15,5 mL de tampão HEPES/KOH 1 mol/L pH 7, 480 µL ATP, 480 µL NADP e 80 µL G6PDH. O volume de 1 µL das enzimas hexoquinase, isomerase fosfoglicose e invertase foram adicionadas sucessivamente. A quantificação foi por espectrofotometria de absorção molecular (340 nm), com cinética de 2 h e medições a cada min.

Para quantificar os teores de proteína e amido, utilizaram-se os pellets formados na extração etanólica. Para a extração da proteína, aos pellets, adicionaram-se 400 µL de NaOH 0,1 mol/L, agitando-se vigorosamente, a 95 °C por 30 min e, em seguida, resfriados à temperatura ambiente. Posteriormente, as misturas foram novamente agitadas (16 000 g por 5 min). A 3 µL do extrato sobrenadante, adicionou-se 180 µL da solução padrão Bradford e determinou-se o teor de proteína por espectrofotometria de absorção molecular (595 nm). O extrato para a determinação do amido foi obtido pela adição de 80 µL de HCl 0,5 mol/L aos pellets. Alíquotas de 40 µL do extrato receberam 60 µL da mistura de degradação do amido (500 µL amiloglicosidase e 5 µL de amilase, centrifugados a 16 000 g por 2 min e diluídos em 25 mL de tampão acetato 50 mmol/L) e foram incubadas a 37 °C por 12 h. Para a determinação do amido, a 25 µL do extrato, adicionou-se 160 µL da mistura de determinação da glicose (15,5 mL de tampão HEPES/KOH 1 mol/L pH 7, 480 µL ATP, 480 µL NADP e 80 µL G6PDH) e a quantificação ocorreu por espectrofotometria de absorção molecular (340 nm) com cinética de 1 h e medições a cada min, com a adição de 2 µL de hexoquinase (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008).

2.4. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação múltipla de médias de Tukey, admitindo-se significância ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico *Statistical Analysis System*.

3. RESULTADOS

A análise das soluções nutritivas evidenciou a estabilidade da ureia em solução, uma vez que a baixa concentração de NH_4^+ e a ausência de NO_3^- na solução nutritiva com ureia e sem o cultivo de plantas (Tabela 1) indicaram que os processos de hidrólise e nitrificação foram limitados. Desta forma, a menor concentração de ureia nas soluções nutritivas com o cultivo das espécies forrageiras indica a absorção da ureia pelas plantas. As concentrações de ureia das soluções contendo apenas esta fonte de N evidenciaram a absorção de 2,90 e 2,68 mmol de ureia pelas plantas de Marandu e Tanzânia, respectivamente (Tabela 1). As concentrações de NH_4^+ e de NO_3^- na solução nutritiva contendo NH_4NO_3 (NA) e $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (NA+U) indicaram que as plantas absorveram mais NO_3^- do que NH_4^+ e a nutrição com NA+U resultou em maior absorção destas formas de N (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração (mmol/L) de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4^+ e NO_3^- na solução nutritiva contendo NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e sem N (-N), após 21 d de crescimento das espécies forrageiras e sem o cultivo de plantas

Espécies	Fonte de N	Concentração (mmol/L)		
		$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	NH_4^+	NO_3^-
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	NA	nd	2,54	0,19
	U	1,92	0,09	nd
	NA + U	0,97	1,83	0,08
	-N	nd	0,12	nd
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	NA	nd	2,76	0,15
	U	2,14	0,07	nd
	NA + U	0,92	1,68	0,07
	-N	nd	0,17	nd
Sem planta	U	4,82	0,07	nd

nd = não detectado

As plantas nutridas com ureia apresentaram menor produção de matéria seca da parte aérea e da planta e maior acúmulo de matéria seca das raízes em relação aos demais suprimentos de N (Figura 1). A maior produção de matéria seca das plantas foi obtida com o suprimento de NA+U, o qual também proporcionou os maiores teores e conteúdo de N das plantas forrageiras (Figura 1). Os teores e conteúdo de N das plantas supridas unicamente com ureia foram menores e ambas as plantas forrageiras apresentaram sintomas visuais de deficiência de N quando cultivadas somente com esta fonte de N. Os menores teores de N evidenciaram a menor absorção de ureia em relação

às demais fontes (Figura 1) contudo, não sugerem capacidade de absorção limitada de ureia.

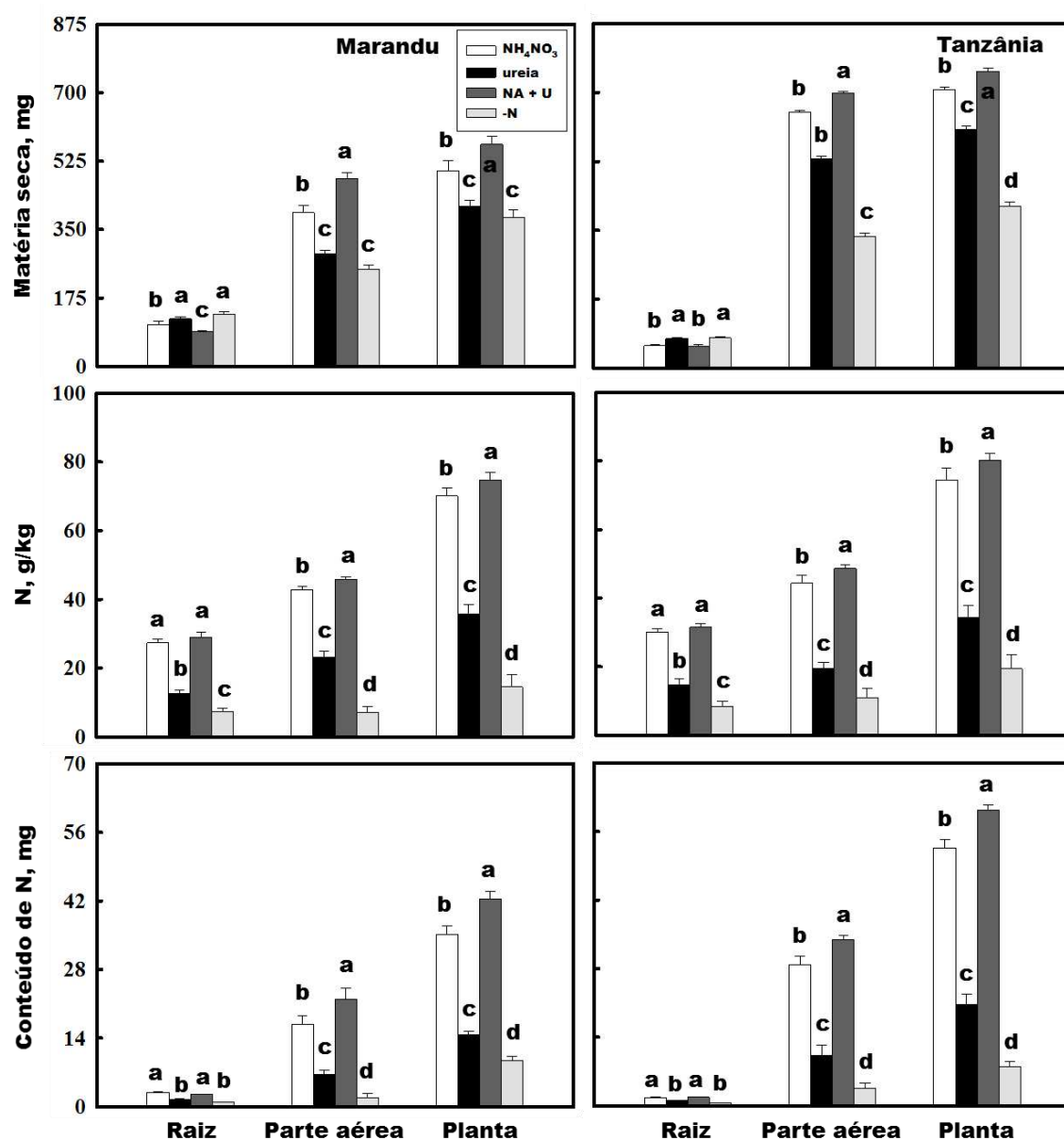


Figura 1 - Produção de matéria seca da raiz, parte aérea e planta, teor e conteúdo de N na raiz, lâminas de folhas recém-expandidas e plantas, após 21 d de crescimento das espécies forrageiras, em resposta ao suprimento de N na forma de NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, $P < 0,05$)

O fornecimento de NA+U resultou em maiores teores de ureia e estes valores foram mais altos nas raízes do que nas folhas das plantas (Figura 2). As plantas nutridas com NA+U apresentaram o maior conteúdo de ureia, evidenciando maior assimilação de ureia (Tabela 2). Os teores de NH_4^+ nas folhas e raízes das plantas de Marandu foram equivalentes, independentemente da forma de N em solução, assim como nas raízes das plantas de Tanzânia (Figura 2). Já o maior teor de NH_4^+ nas folhas da Tanzânia foi obtido no tratamento NA+U. O conteúdo de NH_4^+ das plantas cultivadas com ureia e

com NA não diferiram estatisticamente entre si e o maior conteúdo desta forma de N foi observado com o suprimento de NA+U (Tabela 2). Ambas as espécies apresentaram teores (Figura 2) e conteúdo (Tabela 2) muito baixos de NO_3^- nas folhas e raízes das plantas nutridas exclusivamente com ureia e os maiores teores e conteúdo desta forma de N foram obtidos com suprimento de NA+U.

Com o suprimento único de ureia, as plantas forrageiras apresentaram maiores teores de aminoácidos nas raízes do que nas folhas (Figura 3) no entanto, o conteúdo de aminoácidos não diferiu estatisticamente entre as fontes de N (Tabela 2). Dentre os fornecimentos de N, a nutrição exclusiva com ureia resultou em menores teores (Figura 3) e conteúdo (Tabela 2) de proteína nas plantas e este resultado indica uma limitação metabólica na assimilação de ureia.

Ambas as espécies nutridas com NA+U apresentaram os maiores teores de clorofila, taxa de assimilação de CO_2 (A) e condução estomática (g_s) e menor concentração interna de CO_2 (C_i) (Figura 4). Em relação às demais fontes de N, a ureia proporcionou a menor taxa de assimilação de CO_2 e condução estomática e, conseqüentemente, a maior concentração interna de CO_2 (Figura 4), e também os maiores teores de açúcares e amido (Figura 5). A menor taxa de assimilação de CO_2 e condução estomática (g_s) das plantas supridas apenas com ureia resultou em acúmulo de açúcares e amido e estas limitações estomática e bioquímica foram determinantes para a produção de matéria seca.

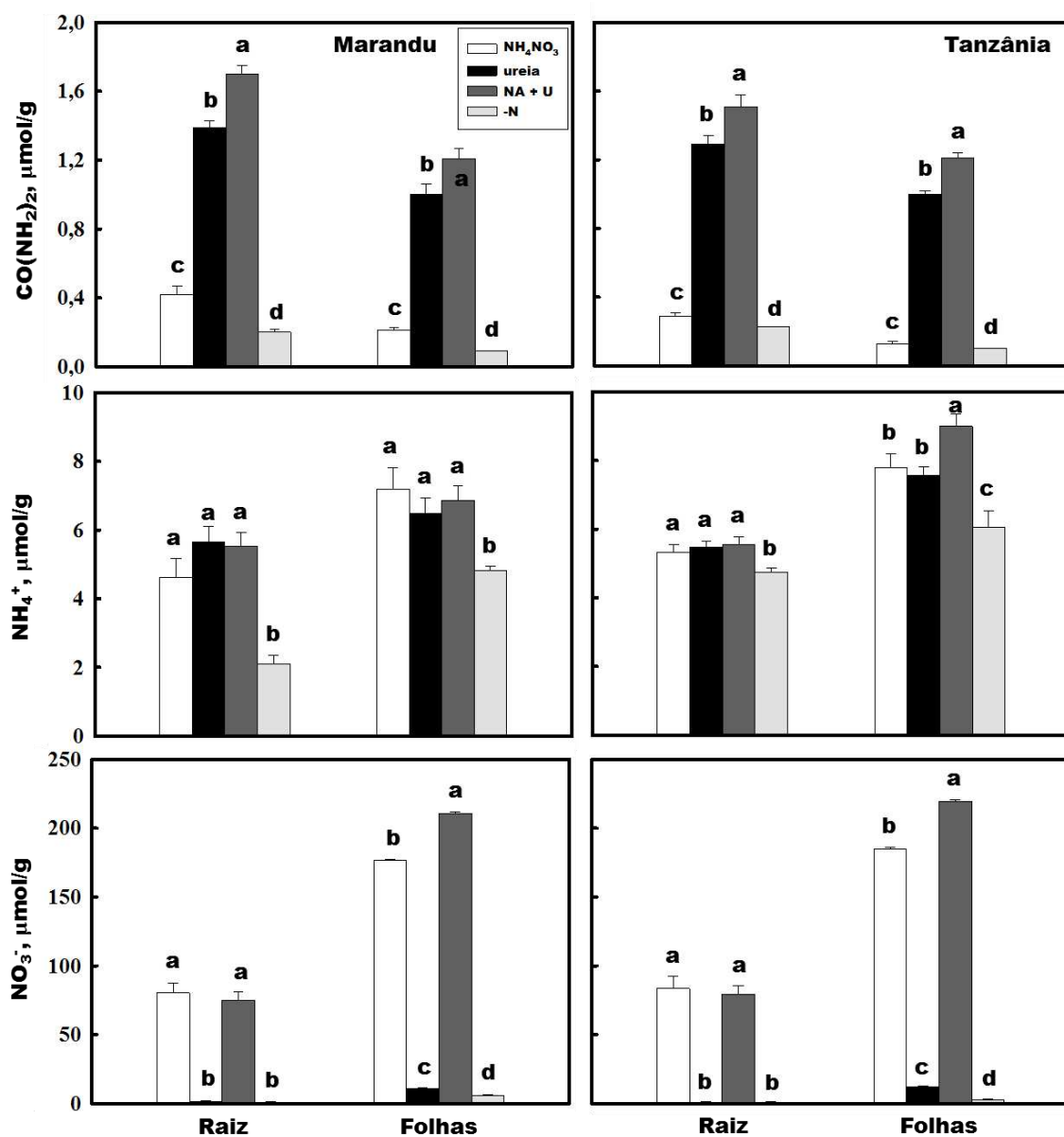


Figura 2 – Teor de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4^+ e NO_3^- na raiz e lâminas de folhas recém-expandidas, após 21 d de crescimento das espécies forrageiras, em resposta ao suprimento de N na forma de NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, $P < 0,05$)

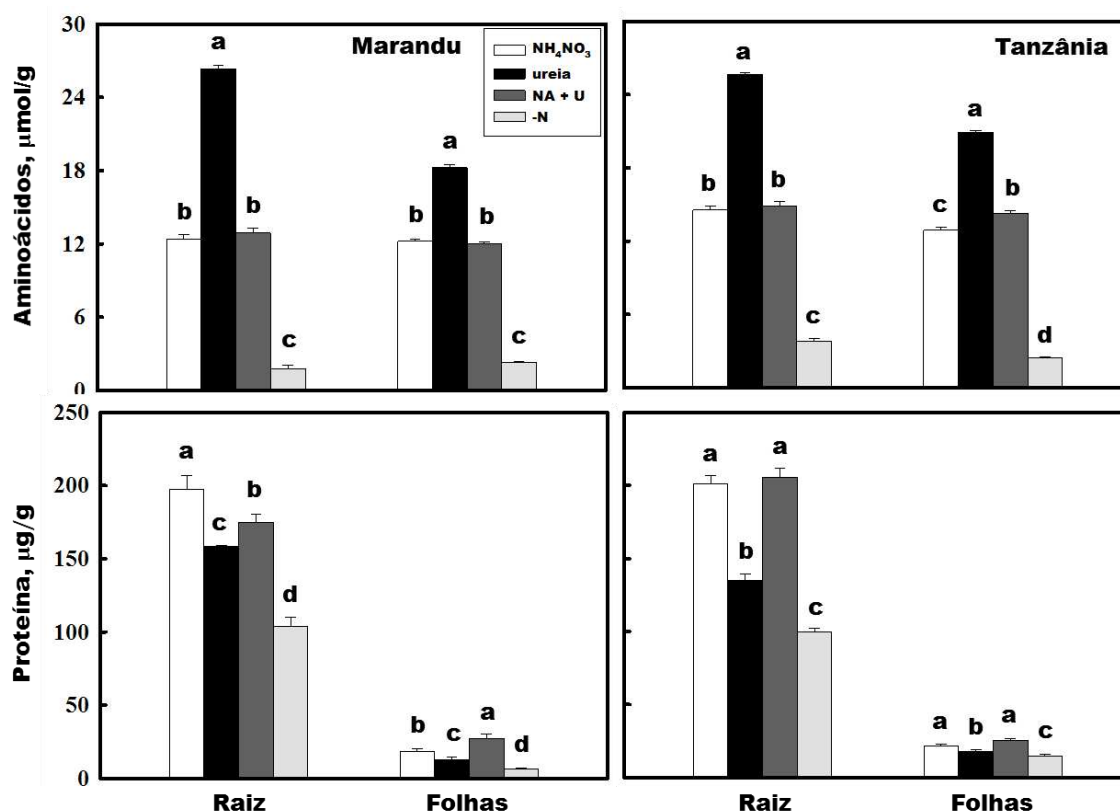


Figura 3 - Teor de aminoácidos e proteínas na raiz e lâminas de folhas recém-expandidas, após 21 d de crescimento das espécies forrageiras, em resposta ao suprimento de N na forma de NH₄NO₃ (NA), CO(NH₂)₂ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, P<0,05)

Tabela 2. Conteúdo (mg) de CO(NH₂)₂, NH₄⁺, NO₃⁻, aminoácidos e proteínas das espécies forrageiras supridas com NH₄NO₃ (NA), CO(NH₂)₂ (U), NA+U e sem N (-N), após 21 d de crescimento

Espécies	Fonte de N	CO(NH ₂) ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Conteúdo (μmol)	
					Aminoácidos	Proteínas
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	NA	0,32 ± 0,01 c	5,91 ± 0,7 b	128,61 ± 12,6 b	12,31 ± 1,2 b	108,07 ± 9,2 a
	U	0,98 ± 0,03 b	4,97 ± 0,8 b	4,91 ± 0,8 c	18,27 ± 0,9 a	69,94 ± 7,8 b
	NA + U	1,65 ± 0,02 a	7,03 ± 0,2 a	162,07 ± 9,8 a	14,12 ± 1,3 b	114,73 ± 8,7 a
	-N	0,11 ± 0,01 d	2,64 ± 0,2 c	2,70 ± 0,3 d	1,56 ± 0,3 c	41,97 ± 5,4 c
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	NA	0,30 ± 0,01 c	9,28 ± 0,6 b	189,98 ± 8,9 b	19,40 ± 1,3 b	157,38 ± 9,7 a
	U	1,39 ± 0,02 b	7,90 ± 0,8 b	8,16 ± 1,1 c	28,20 ± 1,3 a	92,74 ± 7,2 b
	NA + U	2,04 ± 0,02 a	10,95 ± 0,4 a	225,47 ± 11,4 a	22,00 ± 0,9 b	174,63 ± 10,2 a
	-N	0,14 ± 0,01 d	4,43 ± 0,2 c	1,49 ± 0,7 1,0 d	2,57 ± 0,6 c	46,93 ± 7,6 c

Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente a 5 % pelo teste de Tukey

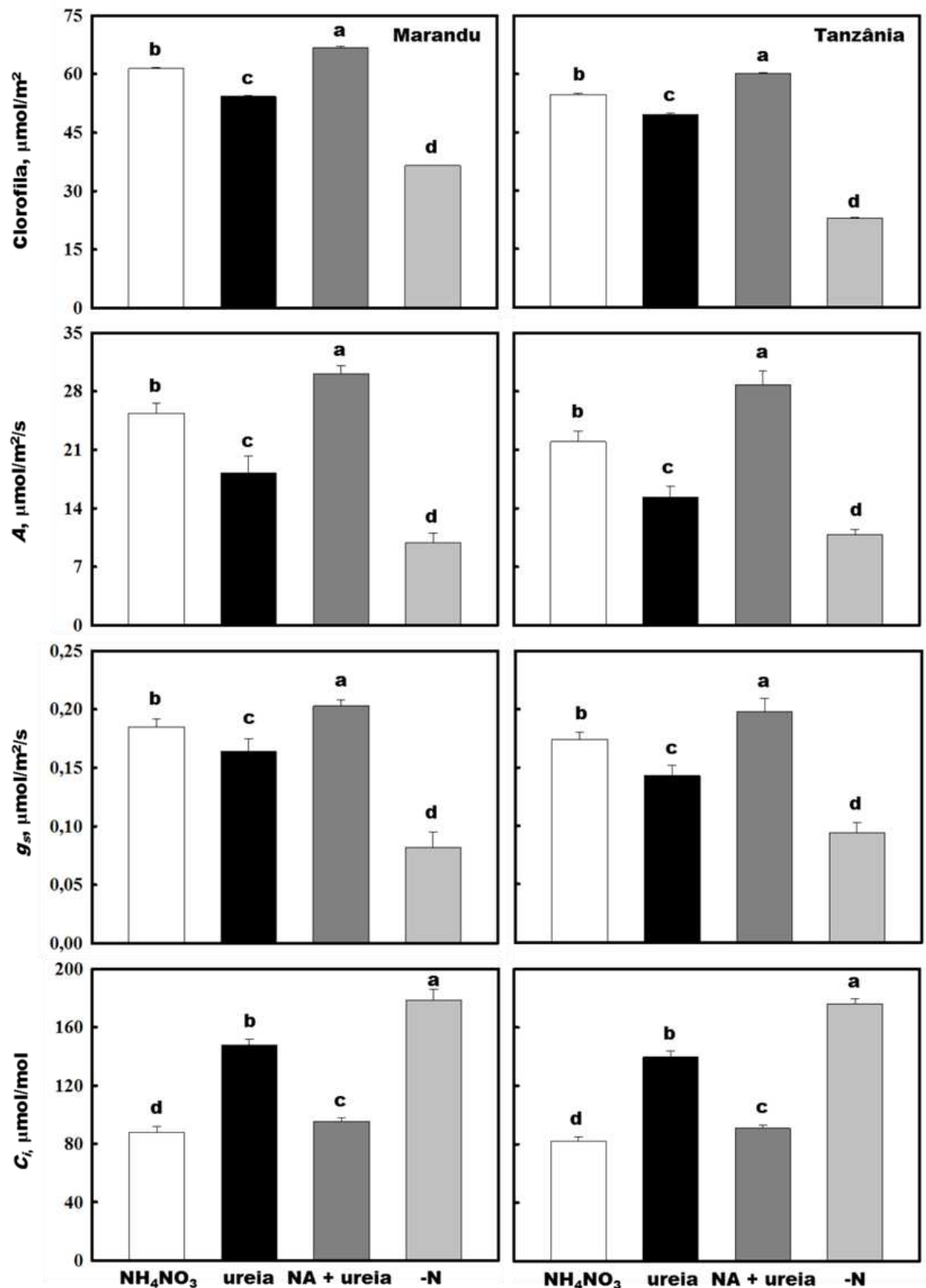


Figura 4 - Teor de clorofila, taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s) e concentração interna de CO_2 (C_i) nas lâminas de folhas recém-expandidas, após 21 d de crescimento das espécies forrageiras, em resposta ao suprimento de N na forma de NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, $P < 0,05$)

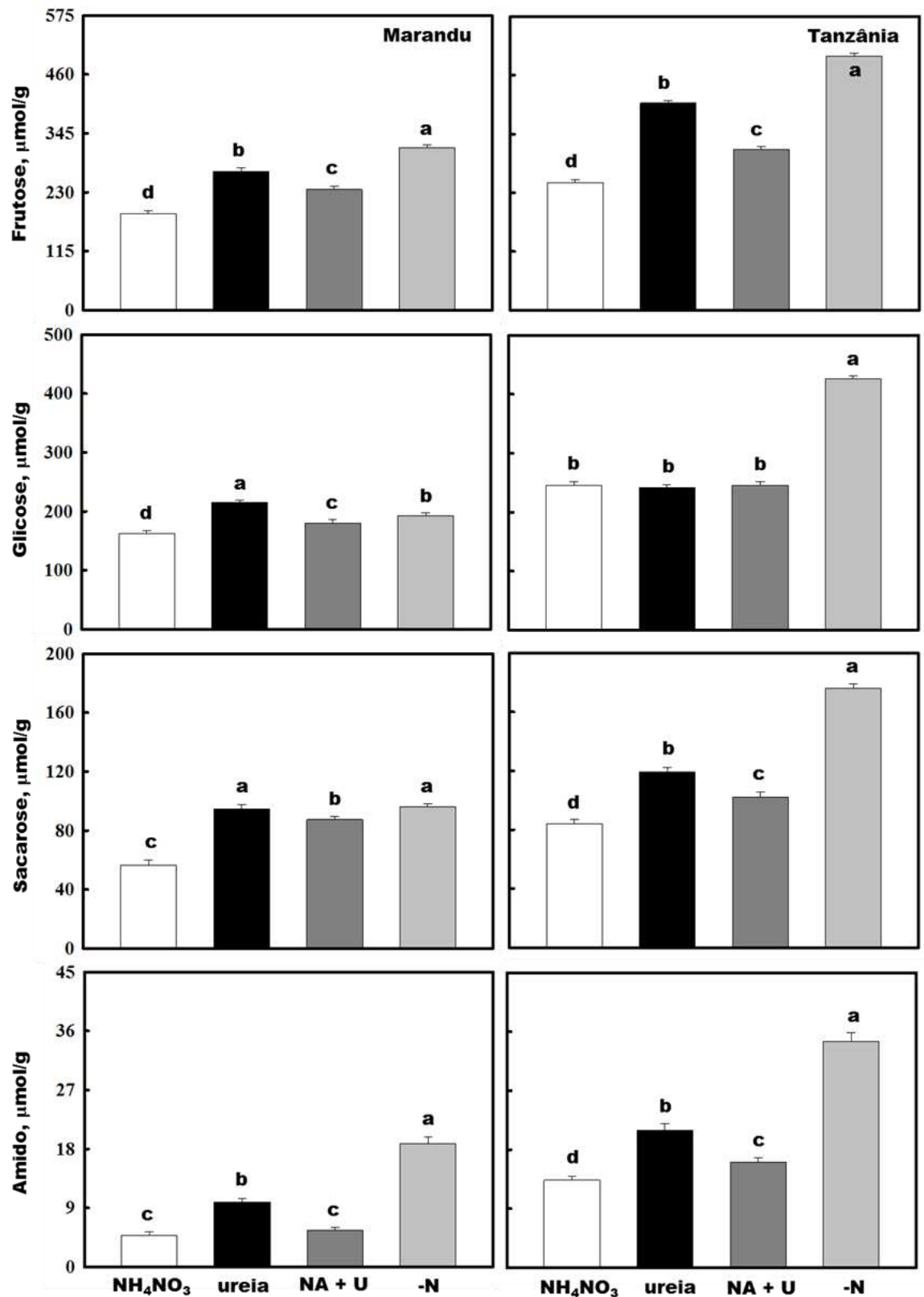


Figura 5 - Teor de frutose, glicose e sacarose e amido nas lâminas de folhas recém-expandidas, após 21 d de crescimento das espécies forrageiras, em resposta ao suprimento de N na forma de NH_4NO_3 (NA), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (U), NA+U e sem N (-N). Linhas sobre as barras indicam os desvios padrões. Barras com mesma letra para cada uma das partes da planta indicam que não houve diferença significativa (Tukey, $P < 0,05$)

4. DISCUSSÃO

Embora a ureia seja absorvida e metabolizada pelas plantas, menor acúmulo de matéria seca e sintomas de deficiência de N têm sido reportados quando a ureia é fornecida exclusivamente em solução nutritiva (Gerendás e Sattelmacher, 1997; Mérigout et al., 2008a; Guarnica et al., 2009, Guarnica et al., 2010a; Cao et al., 2010, Witte, 2011, Polacco et al., 2013). A menor produção de matéria seca (Figura 1) observada nas plantas supridas com ureia parece estar mais relacionada ao suprimento insuficiente de NO_3^- (Figura 2), que limitou a assimilação da ureia (Figura 3) e a atividade fotossintética e seus processos associados (Figuras 4 e 5), do que à limitação da absorção de ureia, uma vez que os teores de N apresentados (Figura 1) foram superiores ao teor médio de 20 g/kg de N considerado adequado para a produção de gramíneas tropicais.

Os maiores teores e conteúdo de ureia das plantas nutridas com NA+U (Figura 2 e Tabela 2) indicaram que a absorção e a assimilação de ureia foram favorecidas na presença de NA. As plantas supridas com NA+U tem apresentado maior acúmulo de matéria seca, o que parece, ao menos parcialmente, estar relacionado à presença de NO_3^- nas plantas (Mérigout et al., 2008a; Guarnica et al., 2009, Guarnica et al., 2010a). Os efeitos positivos do NO_3^- na nutrição com ureia podem estar relacionados ao aumento da atividade da urease e da assimilação do NH_4^+ derivado da hidrólise da ureia pela ativação da enzima glutamina sintetase (Bradley et al., 1989; Houdusse et al., 2005; Guarnica et al., 2009; Cao et al., 2010) e à indução da absorção de ureia (Mérigout et al., 2008a; Guarnica et al., 2010a), como indicado por este estudo.

Ambas as espécies apresentaram maiores teores e conteúdo de aminoácidos nas raízes do que nas folhas (Figura 3 e Tabela 2), sugerindo que a assimilação da ureia ocorreu predominantemente nas raízes. Resultados semelhantes foram constatados em *Arabidopsis* e milho (Mérigout et al., 2008a; Mérigout et al., 2008b), embora em arroz e trigo a assimilação de ureia tenha ocorrido na parte aérea das plantas (Cao et al., 2010; Guarnica et al., 2009). O acúmulo de aminoácidos, e a consequente redução da síntese de proteínas, em plantas nutridas unicamente com ureia está relacionado, provavelmente, ao acúmulo dos aminoácidos glutamina e asparagina, utilizados na translocação do N, ocasionando reduções na assimilação de N em razão da inibição por *feedback* dos produtos de assimilação (glutamina e asparagina), que não são eficientemente translocados (Gerendás e Sattelmacher, 1999; Mérigout et al., 2008a; Wang et al., 2008; Cao et al., 2010; Guarnica et al., 2009; Guarnica et al., 2010a).

As plantas de Marandu e Tanzânia supridas apenas com ureia apresentaram menor atividade fotossintética (Figura 4) e maior acúmulo de açúcares e amido (Figura 5) e estas limitações estomática e bioquímica, responsáveis pela menor produção de matéria seca, possivelmente, também estão relacionadas à presença do NO_3^- . O baixo teor de NO_3^- inibe a expressão dos genes envolvidos na fotossíntese, incluindo a síntese de clorofila e a degradação da proteína (Peng et al., 2007), bem como a expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinina (Miyawaki et al., 2004; Hirose et al., 2008; Garnica et al., 2010b), que pode estar relacionada à síntese de auxinas (Garnica et al., 2010b). A redução da taxa de assimilação de CO_2 está também associada ao alto teor de açúcares e amido nas folhas, acumulados devido à baixa demanda por esses metabólitos. Alto teor de carboidratos, particularmente hexoses, inibe a transcrição de genes que codificam as enzimas envolvidas na fotossíntese e seu acúmulo nos cloroplastos dificulta a chegada do CO_2 aos sítios de carboxilação da Rubisco (Rolland et al., 2006).

5. CONCLUSÕES

Em condições de cultivo em solução nutritiva, a ureia foi absorvida e assimilada pelas raízes das plantas de Marandu e Tanzânia. Apesar da absorção eficiente, a nutrição exclusiva com ureia resultou em menor acúmulo de matéria seca e sintomas de deficiência de N, possivelmente, resultado do suprimento insuficiente de NO_3^- . A presença desta forma de N aumentou a absorção e assimilação de ureia e a atividade fotossintética das plantas, resultando em maior produção de matéria seca.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradeley, D.P.; Morgan, M.A. e O'Toole, P. Uptake and apparent utilization of urea and ammonium nitrate in wheat seedlings. *Fertilizer Research*, 20: 41–49, 1989.

Cao, F.Q.; Werner, A.K.; Dahncke, K.; et al. Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiology*, 154: 98–108, 2010.

De Bona, F. D., Fedoseyenco, D., Wirén, N., Monteiro, F. A. Nitrogen utilization by sulfur-deficient barley plants depends on the nitrogen form. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 237-244, 2011.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Yvin, J.C.; et al. Nitrate modifies urea root uptake and assimilation in wheat seedlings. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 89: 55–62, 2009.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A.M.; et al. Nitrate modifies the assimilation pattern of ammonium and urea in wheat seedlings. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 90: 357–369, 2010a.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A.M.; et al. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1264-1272, 2010b.

Gerendás, J.; Sattelmacher, B. Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. giromontiina). *Plant and Soil*, 196: 217–222, 1997.

Hirose, N.; Takey, K.; Kuroha, T.; et al. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* 59: 75–83, 2008.

Houdusse, F.; Zamarreno, A.M., Garnica, M.; et al. The importance of nitrate in ameliorating the effects of ammonium and urea nutrition on plant development: the relationships with free polyamines and plant proline contents. *Functional Plant Biology*, 32: 1057–1067, 2005.

Houdusse, F.; Garnica, M.; Garcia-Mina, J.M. Nitrogen fertilizer source effects on the growth and mineral nutrition of pepper (*Capsicum annuum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of the Science Food and Agriculture*, 87:2099–2115, 2007.

Mérigout, P; Gaudon, V.; Quilleré, I.; et al., Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 147: 1225–1238, 2008a.

Mérigout, P; Lelandais, F.; Bitton, F.; et al., Urea use efficiency of hydroponically grown maize and wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 31: 427–443, 2008b.

Miyawaki, K.; Matsumoto-Kitano, M.; Kakimoto, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37:128-138, 2004.

Peng, M.; Bi, Y.; Zhu, T.; et al. Genome-wide analysis of Arabidopsis responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. *Plant Molecular Biology*, 65: 775–797, 2007.

Polacco, J.C.; Mazzafera, P.; Tezotto, T. Opinion – Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. *Plant Science*, 199-200: 79-90, 2013.

Rolland, F.; Baena-Gonzales, E.; Sheen, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 675–709, 2006.

Sienkiewicz-Porzucek, A.; Nunes-Nesi, A.; Sulpice, R.; et al. Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. *Plant Physiology*, 147: 115–127, 2008.

Wang, W.H.; Kohler, B.; Cao, F.Q.; et al. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175: 467–477, 2008.

Weatherburn, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39: 971–974, 1967.

Witte, C. P. Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180: 431-438, 2011.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A compreensão do metabolismo, envolvendo a absorção e a assimilação da ureia em plantas, é necessária para avaliar sua contribuição para a nutrição nitrogenada. Em razão da importância da ureia como fonte de N para a agricultura, novos experimentos envolvendo a determinação da atividade das enzimas urease, nitrato redutase e glutamina sintetase e do perfil de aminoácidos são precisos para investigar as rotas metabólicas da ureia e a influência do NO_3^- na absorção e assimilação da ureia pelas plantas.