

JULIANA CARVALHO GONÇALVES DIAS DE MEDEIROS

**METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM *Phaseolus vulgaris* L.  
DURANTE SENESCÊNCIA FOLIAR INDUZIDA POR  
DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
SETEMBRO – 1999

JULIANA CARVALHO GONÇALVES DIAS DE MEDEIROS

**METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM *Phaseolus vulgaris* L.  
DURANTE SENESCÊNCIA FOLIAR INDUZIDA POR  
DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 5 de março de 1999.

---

Prof. Carlos A. Martinez y Huaman

---

Prof. Paulo Cezar Rezende Fontes

---

Prof. Mercedes M.C. Bustamante  
(Conselheira)

---

Prof. Fábio Murilo Da Matta  
(Conselheiro)

---

Prof. Paulo Roberto Mosquim  
(Orientador)

*Aos meus pais, Adovaldo e Maria Teresa.*

## AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Adovaldo e Maria Teresa, e aos meus irmãos, Mônica, Virgínia, Flávia, Ana Rosa e Adovaldo Filho, por me fazerem tão feliz, sempre.

A toda minha família, em especial, minhas avós Nini e Julita, minha madrinha Emília, e meu cunhado Alexandre.

Às amigas de toda a vida, Lelé e Bê.

Aos novos amigos, Patrícia, Natalia, Diego, Dil, Renis, Fernando, Claudivan, Penha, Marlos, Aliçandro, Alberto, Jay, Priminho, Fábio, Neudes, Armando, Silvana, Marco Antônio Jailson, Ronaldo, Gil, Héliida Tatá, Teté, Sônia, Wellington, Walder, Juraci e Luiz Fernando.

Ao professor Paulo Roberto Mosquim, pela confiança e orientação.

À professora Mercedes Bustamante, pela amizade e pelo exemplo.

Aos professores Fábio M. Da Matta, Marco Aurélio Pedron e Silva, Carlos Alberto Martinez, Paulo Rezende Fontes, e Raimundo Santos Barros, pelas valiosas sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores Celina Martin, Heloísa Miranda, Marcelo Valle e Linda Caldas, que tanto contribuíram para minha formação.

Aos professores Augusto C. Franco e Mercedes Bustamente, pela oportunidade de trabalhar no exterior.

Ao professor Rafael Ratajczak e a todo o pessoal do AG Lüttge e WG, por me receberem tão bem em Darmstadt, pela ajuda na determinação das isoformas de GS, e por me apresentarem o fascinante mundo das membranas.

Ao professor José Eustáquio Carneiro, pelas sementes.

Ao professor Júlio C. Lima Neves, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Paulo Afonso da Silva, pela editoração final.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, especialmente Zé Maria, Carlos, Geraldo e o pessoal da secretaria.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG e ao DAAD, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

## **BIOGRAFIA**

JULIANA CARVALHO GONÇALVES DIAS DE MEDEIROS, nasceu em 24 de outubro de 1971, em Oeiras, Piauí.

Em janeiro de 1996, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília. Em março de 1996, iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo tese em março de 1999.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
EXTRATO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1. Material vegetal e condições de cultivo .....	4
2.2. Coletas .....	5
2.3. Determinações de fósforo e de nitrogênio total .....	5
2.4. Atividades enzimáticas .....	5
2.4.1. Sintetase da glutamina .....	6
2.4.2. Desidrogenase do glutamato .....	6
2.4.3. Redutase do nitrato .....	6
2.5. Determinação das isoformas de GS .....	7
2.6. Delineamento experimental e análise estatística .....	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
3.1. Teores de fósforo e de nitrogênio total .....	9
3.2. Teores de clorofilas e de proteínas solúveis .....	12
3.3. Atividades enzimáticas .....	15
3.3.1. Sintetase da glutamina .....	16
3.3.2. Desidrogenase do glutamato .....	18
3.3.3. Redutase do nitrato.....	21
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

## EXTRATO

MEDEIROS, Juliana Carvalho Gonçalves Dias de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 1999. **Metabolismo do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. durante senescência foliar induzida por deficiência de fósforo.** Orientador: Paulo Roberto Mosquim. Conselheiras: Mercedes Maria da Cunha Bustamante, Fábio Murilo Da Matta e Marco Aurélio Pedron e Silva.

Com o objetivo de verificar se a deficiência de P é um sistema experimental adequado para o estudo da senescência, e se há redistribuição mais eficiente de P em cultivares melhoradas para menor requerimento, foi avaliado o metabolismo de N durante senescência foliar induzida por deficiência de P, em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. com diferentes requerimentos de P. Plântulas das cultivares POT 51 (baixo requerimento) e Pérola (alto requerimento) foram crescidas em solução nutritiva completa, e, em seguida, transferidas para soluções deficientes em P. Após uma semana de deficiência, foram medidos, a cada três dias, nos trifólios senescentes, os teores de clorofilas e proteínas solúveis e as atividades da NR, da GS e da NADH-GDH. Também foram determinados os níveis das isoformas citossólica (GS<sub>1</sub>) e cloroplastídica (GS<sub>2</sub>) de GS e os teores de N e P (medidos também no trifólio mais jovem completamente expandido). Nas duas cultivares, tanto em senescência natural quanto induzida, foi observada remobilização de N, sendo esta, acelerada após aplicação da deficiência. Os níveis de N se mantiveram nos trifólios jovens, enquanto os de P caíram, paralelamente aos dos trifólios senescentes. Nas duas cultivares, a indução de senescência acelerou o início

da perda de clorofila, mas não da de proteínas solúveis. As atividades da GS e da NR caíram progressivamente, sendo a queda acelerada após aplicação da deficiência, nas duas cultivares. Tanto durante senescência natural quanto induzida, a queda da atividade da GS foi causada pela diminuição dos níveis de GS<sub>2</sub>. Os níveis de GS<sub>1</sub> aumentaram, sugerindo seu papel na remobilização de N. As atividades real e potencial da NR foram mais altas em Pérola que em POT 51, tanto em senescência natural quanto induzida. Apenas nos estádios mais avançados, as cultivares apresentaram atividades iguais. Durante senescência natural, a atividade da NR apresentou limitação por substrato nas duas cultivares. Em senescência induzida, a atividade foi limitada, possivelmente, pela concentração da enzima. Em Pérola, a atividade da NADH-GDH diminuiu durante a senescência natural e aumentou durante a induzida. Em POT 51, a atividade manteve-se constante e não houve efeito de tratamento. Durante a senescência induzida, a maioria dos parâmetros acompanhados apresentou perfis similares aos observados durante a natural. Conclui-se que a aplicação da deficiência de P é um sistema adequado para o estudo do metabolismo de N durante a senescência foliar em feijão. Não ficou claro se POT 51 é mais eficiente na remobilização de P.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Juliana Carvalho Gonçalves Dias de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 1999. **Leaf nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. during senescence induced by phosphorus deprivation.** Adviser: Paulo Roberto Mosquim. Committee members: Mercedes Maria da Cunha Bustamante, Fábio Murilo Da Matta and Marco Aurélio Pedron e Silva.

The leaf N metabolism during senescence induced by P deprivation was evaluated in two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. differing in phosphorus requirement. Seedlings of POT 51 (low P requirement) and Pérola (high P requirement) were grown in hydroponic culture (Hoagland, half strength) for ten days, and then submitted to P deprivation. After one week of deprivation, total chlorophyll and soluble protein contents, and nitrate reductase (NR), glutamine synthetase (GS) and glutamate dehydrogenase (GDH) activities were determined every three days, in the oldest leaf. Changes in the levels of cytosolic (GS<sub>1</sub>) and chloroplastic (GS<sub>2</sub>) glutamine synthetase, and nitrogen and phosphate contents (determined in the completely expanded youngest leaf too) were also determined. After twenty days of culture on P deficient medium, shoot/root fresh mass ratio was reduced in Pérola, but not in POT 51. In both cultivars and treatments N remobilization was observed. P content in young leaves declined parallel to the decrease observed in the oldest ones. Both cultivars showed the same pattern of chlorophyll and protein contents. Total chlorophyll content declined continuously throughout induced senescence while

soluble protein was not affected. Pérola reached higher chlorophyll values and, after twenty days of deprivation, the loss of total chlorophyll was greater than in POT 51. The overall enzymatic activity decreased in both cultivars and treatments. In POT 51, total GS activity decreased faster during P deprivation. Pérola showed the same pattern of total GS activity in both treatments, but the loss of activity was higher during deprivation. In both cultivars and treatments the loss of total GS activity was due to the decrease in GS<sub>2</sub> levels. In contrast, GS<sub>1</sub> polypeptides increased, which suggest a role in nitrogen remobilization during senescence. Pérola GDH activity decreased during natural senescence and increased during senescence induced by P deprivation. POT 51 GDH activity showed a little fluctuation but no treatment effect was observed. During the early phases of senescence (induced or not), both real and potential NR activity were higher in Pérola. In advanced stages no differences between the cultivars were observed. During natural senescence, NR activity was limited by nitrate availability, in both cultivars. During the deprivation, NR activity was probably limited by the low levels of NR.

## 1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de P é um dos principais determinantes do crescimento vegetal. Dentre outros efeitos, têm sido relatadas, em resposta à deficiência desse elemento, redução na taxa fotossintética (JACOB e LAWLOR, 1994; PLENISCAR et al., 1994) e acelerada perda de proteínas solúveis (CAKMAK et al., 1994). USUDA (1995) relata que a deficiência de P induz a iniciação e eleva a taxa de remobilização de N em folhas de milho. Uma vez que a exportação de nutrientes de tecidos velhos para tecidos jovens, sementes ou órgãos de reserva é característica da senescência foliar, postula-se que o *status* de P nas folhas esteja envolvido na regulação da senescência mediante aceleração da remobilização de N (USUDA e SHIMOGAWARA, 1995).

A senescência é o estágio final do desenvolvimento foliar (GAN e AMASINO, 1997). Trata-se de um processo altamente regulado, porém a seqüência precisa de eventos e os mecanismos responsáveis por sua iniciação não foram ainda elucidados (FELLER e FISCHER, 1994; BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; GAN e AMASINO, 1997). Em relação ao metabolismo de N, tem-se a transição da assimilação para remobilização (FELLER e FISCHER, 1994), e podem-se observar mudanças marcantes na expressão e na atividade das enzimas envolvidas na redução do nitrato e assimilação do amônio. As atividades das redutases do nitrato (NR) e do nitrito decrescem durante os estádios iniciais de senescência e freqüentemente não são detectáveis em

estádios avançados (FELLER e FISCHER, 1994). Também se observa queda na atividade geral das enzimas de assimilação de amônio, porém as contribuições relativas das isoformas devem ser consideradas.

Mudanças no padrão de isoformas durante a senescência têm sido relatadas principalmente para sintetase da glutamina (GS). Em folhas, essa enzima apresenta isoformas citossólica (GS<sub>1</sub>) e cloroplastídica (GS<sub>2</sub>), sendo GS<sub>2</sub> a principal responsável pela assimilação do amônio originado da fotorrespiração (LAST, 1993), e GS<sub>1</sub>, pela remobilização de N (KAMACHI et al., 1991). Esses papéis são reforçados pela localização das isoenzimas, com GS<sub>2</sub> apresentando-se principalmente em células do mesofilo e GS<sub>1</sub>, em feixes vasculares (KAMACHI et al., 1992). Durante a senescência, a atividade de GS<sub>2</sub> decresce progressivamente, enquanto a de GS<sub>1</sub> é mantida ou incrementada (TIRADO et al., 1990; PÉREZ-RODRÍGUEZ e VALPUESTA, 1996). Para a desidrogenase do glutamato mitocondrial (NADH-GDH), encontram-se relatos de aumento (PEETERS e van LAERE, 1992; WATANABE et al., 1998), queda (KAMACHI et al., 1991) e manutenção de sua atividade (CRAFTS-BRANDNER et al., 1998).

A senescência pode ser induzida artificialmente por escuridão ou destacamento do órgão (PEETERS e van LAERE, 1992). Entretanto, essas abordagens freqüentemente levam ao aparecimento de artefatos. O destacamento de folhas, por exemplo, impossibilita a remobilização de nutrientes, levando a um acúmulo de compostos não observado durante a senescência natural (BECKER e APEL, 1993; USUDA e SHIMOGAWARA, 1995).

Segundo SMART (1994), a deficiência de nutrientes móveis é um iniciador de senescência natural, e acredita-se que a deficiência de P possa ser um sistema experimental adequado para examinar-se a senescência na ausência de artefatos relacionados à transição claro-escuro ou ao destacamento (USUDA e SHIMOGAWARA, 1995). Assim, espera-se que os eventos observados durante senescência natural apresentem as mesmas tendências durante senescência induzida por deficiência de P, sendo apenas acelerados.

Também, é possível que essa abordagem permita evidenciar uma redistribuição mais eficiente de P em cultivares melhoradas para menor

requerimento desse elemento, uma vez que, caso as cultivares melhoradas realmente remobilizem P mais eficientemente, a deficiência de P levaria à senescência ainda mais acelerada.

Neste trabalho, avaliou-se o metabolismo de N durante a senescência foliar induzida por deficiência de P, em duas cultivares de feijão com diferentes requerimentos desse nutriente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas de *Phaseolus vulgaris* L., cultivares Pérola e POT 51, consideradas, respectivamente, sensível e tolerante à baixa disponibilidade de P. A cultivar POT 51 foi desenvolvida no CIAT, sendo a produção de sementes o critério de tolerância adotado em sua seleção (prof. José Eustáquio Carneiro - Departamento de Fitotecnia, UFV, comunicação pessoal). A cultivar Pérola tem seu plantio recomendado em Minas Gerais pela EMBRAPA.

As sementes (cedidas pelo prof. José Eustáquio Carneiro) foram desinfestadas em etanol 70% e germinadas em areia lavada. Cinco dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para caixas de isopor (5 L, duas plantas por caixa) contendo solução nutritiva de Hoagland meia-força (HOAGLAND e ARNON, 1950), por dez dias, e, em seguida, para soluções deficientes em P (senescência induzida), ou não (senescência natural). Na solução deficiente em P, o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi substituído por KCl.

As soluções foram trocadas a cada três dias e o pH mantido entre 5,5 e 6,5. O cultivo foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20°45' S e 42°51' W), em condições naturais de luminosidade e temperatura, entre os meses de novembro de 1997 e fevereiro de 1998.

## 2.2. Coletas

Inicialmente foi feito um experimento preliminar para determinação do período de coletas. Foi medido semanalmente, em folhas marcadas, o teor de verde (SPAD 500, Minolta Co), tomado como medida indireta do teor de clorofilas. A queda desse parâmetro foi considerada início de senescência.

No experimento definitivo, as coletas (num total de cinco) foram realizadas a cada três dias, sendo iniciadas quatro dias antes do estabelecido como início de senescência nas plantas submetidas ao tratamento. As análises minerais foram feitas nas folhas senescentes e no trifólio mais novo completamente expandido (de uma mesma planta), enquanto os teores de clorofilas e proteínas solúveis, as atividades enzimáticas e a dinâmica das isoformas de GS foram avaliados nas folhas senescentes, apenas.

## 2.3. Determinação de fósforo e nitrogênio total

O material foi seco, moído e submetido à digestão sulfosalicilica (NELSON e SOMMERS, 1973). O teor de N total foi determinado pelo método de Nessler (LANG, 1958) e o de P, pelo procedimento proposto por FISKE e SUBBAROW (1925).

## 2.4. Atividades enzimáticas

Foram avaliadas as atividades da redutase de nitrato, sintetase da glutamina e desidrogenase do glutamato. A atividade da redutase de nitrato foi avaliada mediante ensaio *in vivo*, enquanto a da sintetase da glutamina e da desidrogenase do glutamato foram avaliadas *in vitro*.

Para extração, o material fresco foi pesado, triturado em nitrogênio líquido e adicionado ao tampão de extração (Tris  $100 \text{ mol m}^{-3}$ , pH 8,0 +  $\text{MgSO}_4$   $50 \text{ mol m}^{-3}$  +  $\beta$ -mercaptoetanol  $5 \text{ mol m}^{-3}$  + EDTA  $1 \text{ mol m}^{-3}$ ), na proporção de 2 mL de tampão para 1 g de folha (OCHS et al., 1995). Seguiu-se centrifugação a  $15.000 \text{ g}$ , por 30 min a  $4^\circ\text{C}$ , sendo o resíduo descartado e o sobrenadante tomado como extrato enzimático. O conteúdo de proteínas solúveis do extrato enzimático foi determinado como descrito por BRADFORD (1976).

#### **2.4.1. Sintetase da glutamina (EC 6.3.1.2)**

A 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram adicionados 2,8 mL do meio de reação (Tris 50 mol  $\text{m}^{-3}$ , pH 7,5 + ATP 6,25 mol  $\text{m}^{-3}$  +  $\text{MgSO}_4$  45 mol  $\text{m}^{-3}$  + hidroxilamina-HCl 6,25 mol  $\text{m}^{-3}$  + L-glutamato 93,75 mol  $\text{m}^{-3}$ ). A mistura foi incubada a 30°C por 20 min, quando foi adicionado 1,5 mL do reagente férrico (TCA 0,2 kmol  $\text{m}^{-3}$  +  $\text{FeCl}_3$  0,37 kmol  $\text{m}^{-3}$  + HCl 0,67 kmol  $\text{m}^{-3}$ ). A absorvância foi lida em 540 nm (adaptado de JUNGHANS e MOSQUIM, 1995).

#### **2.4.2. Desidrogenase do glutamato (EC 1.4.1.2)**

A 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram adicionados 2,8 mL do meio de reação (Tris 50 mol  $\text{m}^{-3}$ , pH 8,2 +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  100 mol  $\text{m}^{-3}$  +  $\text{CaCl}_2$  1 mol  $\text{m}^{-3}$  + 2-oxogutarato 12,5 mol  $\text{m}^{-3}$  + NADH 0,1 mol  $\text{m}^{-3}$ ). Seguiu-se leitura da absorvância em 340 nm e incubação em banho-maria a 30°C por 10 min, quando foi feita uma nova leitura (adaptado de JUNGHANS e MOSQUIM, 1995).

#### **2.4.3. Redutase do nitrato (EC 1.6.6.1)**

Foram determinadas as atividades real e potencial da redutase do nitrato. O material destacado foi cortado, pesado e transferido para seringa com tampão Tris 50 mol  $\text{m}^{-3}$ , pH 7,5 + 1% n-propanol (atividade real) +  $\text{KNO}_3$  50 mol  $\text{m}^{-3}$  (atividade potencial), onde sofreu infiltração sob vácuo. O volume foi ajustado para 5 mL e duas alíquotas de 1 mL cada (tempo 0), retiradas. Seguiu-se incubação em escuro e anaerobiose por 60 min, quando mais duas alíquotas (tempo 60) foram retiradas. Às alíquotas foram adicionados 1mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N e 1mL de dicloridrato N-1 naftiletlenodiamina 0,02% (NNED). A absorvância foi lida em 540 nm (KOZOVITS, 1997). As determinações foram feitas sempre entre 9:00 e 11:00h da manhã.

## **2.5. Detecção das isoformas de GS por western-blotting**

O extrato enzimático foi submetido a SDS-PAGE, 12,5%, em corrente constante (LAEMMLI, 1970). Os polipeptídeos foram transferidos para uma membrana de PVDF (Bio-Rad Transblot, 15V, por 45 min) como previamente descrito (HAYAKAWA et al., 1990). Após transferência, a membrana foi bloqueada com tampão TBS 1X pH 7,5 + leite 2%, por 60 min. Em seguida foram adicionados os anticorpos primários (anti-GS<sub>2</sub>, gentilmente cedido por Hitoshi Sakakibara e Tatsuo Sugiyama - Nagoya University, Japão) e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, nesta ordem, e na proporção de 1:1000. Para revelação, foi feita incubação em solução DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + uréia por 10 min.

## **2.6. Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi executado em esquema fatorial 2 x 2, com duas cultivares de feijão, dois níveis de P, e quatro repetições por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após vinte dias de deficiência de P (senescência induzida), as plantas das duas cultivares apresentaram diferenças visíveis no crescimento do sistema radicular e da parte aérea, em relação às plantas-controle (senescência natural). Em POT 51, as massas frescas da parte aérea e do sistema radicular caíram 25% e 28%, respectivamente. Em Pérola, a massa fresca da parte aérea caiu 27%, enquanto a do sistema radicular se manteve constante. Assim, a relação de massa fresca parte aérea/raiz não foi alterada pelo tratamento em POT 51, e decresceu significativamente em Pérola (Quadro 1).

As plantas da cultivar Pérola, considerada sensível à deficiência de P, tiveram crescimento menos afetado pelo tratamento que as da cultivar POT 51, considerada tolerante. Em relação à massa fresca total, Pérola apresentou queda de 18% e POT 51, de 25%, em relação às plantas-controle (Quadro 1).

Poder-se-ia interpretar esses resultados como uma contradição: o crescimento da cultivar considerada tolerante é mais susceptível à deficiência de P. Entretanto, considerando-se que a seleção de POT 51 baseou-se na produção de grãos, é possível que essa variedade invista mais em estruturas reprodutivas que em crescimento, e assim mantenha sua produtividade em condições de baixo suprimento de P. Também é possível que POT 51 consiga explorar melhor o ambiente radicular, mesmo com menor crescimento, por alteração do ângulo de crescimento da raiz principal (não acompanhado neste

Quadro 1 - Massa fresca da parte aérea e do sistema radicular de plantas (35 dias) de duas cultivares de feijão, em senescência natural e em senescência induzida por vinte dias deficiência de P

Cultivar / Parâmetro	POT 51		Pérola	
	Senescência natural	Senescência induzida	Senescência natural	Senescência induzida
Massa fresca da parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	72,57 a	55,68 b	78,50 a	57,31 b
Massa fresca da raiz (g planta <sup>-1</sup> )	25,65 a	18,44 b	28,22 a	30,15 a
Parte aérea / raiz	2,83 a	2,96 a	2,78 a	1,90 b
Massa fresca total (g planta <sup>-1</sup> )	98,22 a	74,12 b	106,72 a	87,46 b

Em cada linha, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

trabalho), como já demonstrado para outras cultivares que também apresentam menor requerimento de P (BONSER et al., 1996).

### 3.1. Teores de fósforo e de nitrogênio total

Pode-se observar, na Figura 1, que as duas cultivares apresentaram teores de P similares. Durante a senescência induzida, o teor de P caiu rapidamente, nos trifólios senescentes e jovens. Observa-se uma queda brusca, de aproximadamente 50%, até o décimo dia de deficiência, e a partir de então, conteúdo aproximadamente constante. Durante senescência natural, essa queda é gradativa, de aproximadamente 50% nos trifólios jovens das duas cultivares, e de 77% e 60% nos trifólios senescentes de POT 51 e Pérola, respectivamente. Nas duas cultivares, durante a senescência natural e a induzida, o teor de P dos trifólios jovens acompanhou o dos trifólios senescentes, caracterizando uma remobilização insuficiente para manutenção dos níveis de P nos trifólios jovens. DOMINGUES (1998), trabalhando com feijão submetido à deficiência de P, também observou queda no teor desse

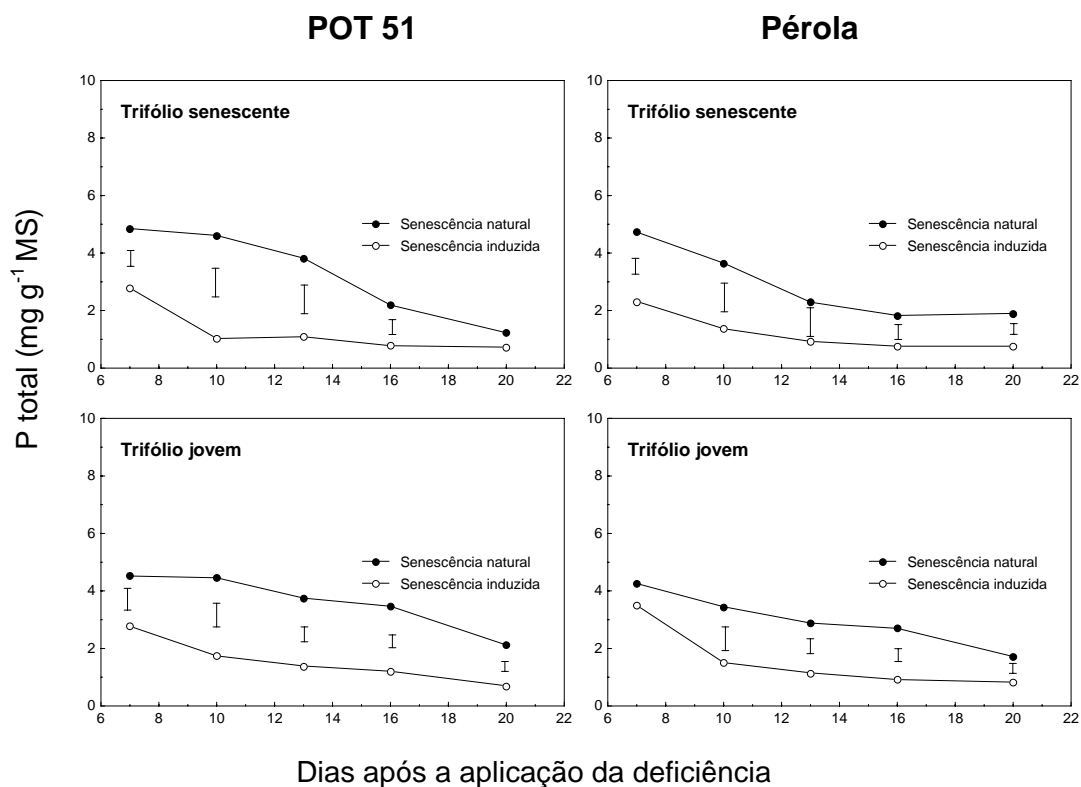


Figura 1 - Teor de P em trifólios senescentes e jovens de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P. As barras representam a diferença mínima significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

elemento nos trifólios jovens, apesar da grande remobilização (queda de 86%, nos trifólios velhos).

Nas duas cultivares, durante senescência natural e induzida, foi observada remobilização de N. O teor de N nos trifólios senescentes decresceu progressivamente, enquanto o do trifólio mais jovem manteve-se constante. Foram observados decréscimos de 22% e 38% para POT 51, e 28% e 45% para Pérola, nos trifólios mais velhos, durante senescência natural e induzida, respectivamente (Figura 2).

A remobilização de N é determinada por fatores externos, como flutuação do suprimento mineral e autônomos (internos), como o início do período reprodutivo (FELLER e FISCHER, 1994; BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; GAN e AMASINO, 1997). Durante a senescência, geralmente se observa grande diminuição no conteúdo de N foliar, entre 60% e 90% (CRAFTS-

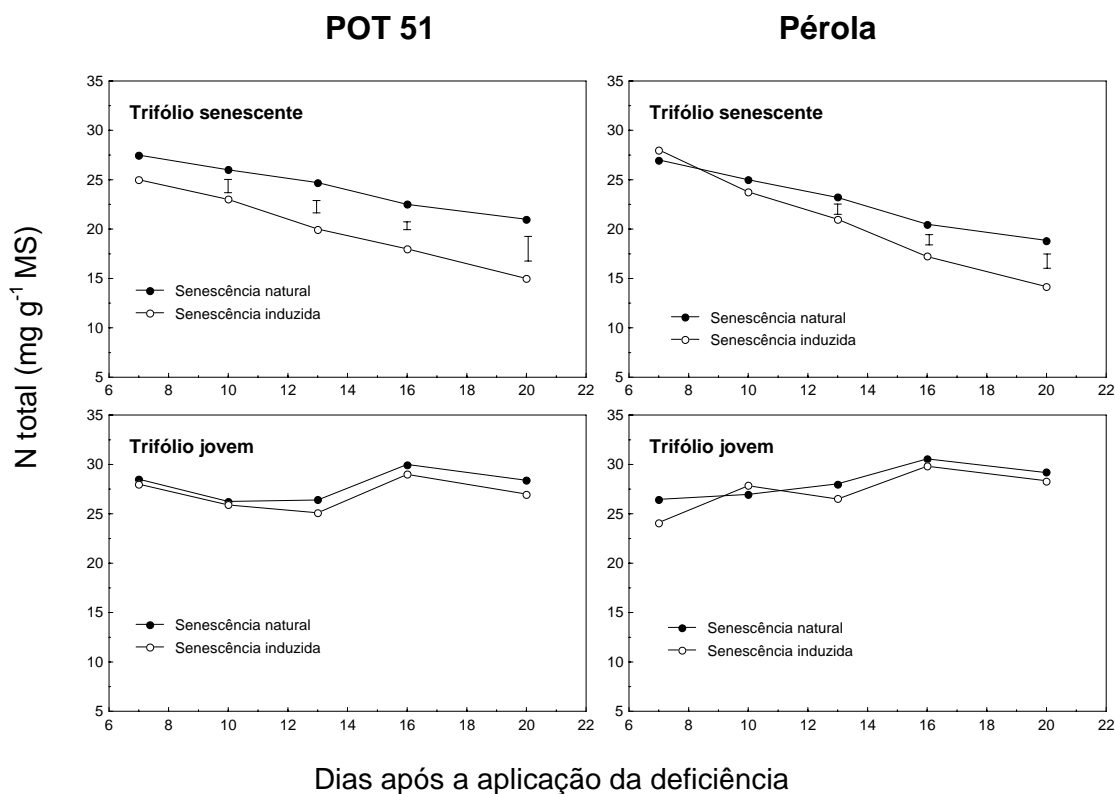


Figura 2 - Teor de N total em trifólios senescentes e jovens de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P. As barras representam a diferença mínima significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

BRANDNER, 1992; BAKKEN et al., 1998), que é realocado para órgãos reprodutivos ou em crescimento. Esses valores são bastantes superiores aos encontrados neste estudo, mesmo durante senescência induzida. É possível que a grande quantidade de N disponível no meio de cultivo tenha diminuído a remobilização desse elemento. Queda da remobilização de nutrientes, aplicados em níveis supra-ótimos também foi observada por CRAFTS-BRANDNER (1992). Ainda, é possível que essas cultivares de feijão apresentem geneticamente baixa taxa de remobilização de N, uma vez que seu melhoramento não visou, diretamente, essa característica.

Durante a senescência natural o teor de N caiu paralelamente ao de P. Entretanto, durante a senescência induzida, a queda no teor de P precedeu a de N, que mostrou-se acelerada pela deficiência (Figuras 1 e 2). Resultados semelhantes levaram USUDA e SHIMOGAWARA (1995) a postular o envolvimento do P na regulação da senescência mediante aceleração da

remobilização de N. Esse envolvimento é apenas sugerido pelos dados aqui apresentados, uma vez que os mesmos não permitem inferências sobre relação de causa e consequência.

### **3.2. Teores de clorofilas e de proteínas solúveis**

Tanto durante senescência natural quanto induzida, as duas cultivares apresentaram comportamento semelhante em relação aos teores de clorofilas (medidos indiretamente pelas leituras SPAD) e de proteínas solúveis (Figuras 3 e 4). Durante a senescência natural, foram observados decréscimos nos teores de clorofilas (considerado início de senescência) e de proteína, a partir do 16<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dia de tratamento, respectivamente. Pérola atingiu níveis mais altos de clorofilas e apresentou perda significativamente mais acentuada que POT 51. Após 20 dias de deficiência, as perdas de clorofilas, em relação ao valor máximo, foram de 42% para POT 51, e de 59% para Pérola.

A indução da senescência acelerou o início da queda do teor de clorofilas, da mesma forma, nas duas cultivares. Sendo este o parâmetro considerado início de senescência, POT 51 não apresentou senescência foliar anterior à de Pérola, após aplicação da deficiência de P, como esperado.

A queda do teor de proteínas solúveis foi acelerada, nas duas cultivares, porém somente a partir do 13<sup>o</sup> dia após aplicação da deficiência (Figura 4). Era esperada a aceleração do início da perda de proteínas solúveis, durante a senescência induzida, uma vez que a queda do teor de N foliar teve seu início antecipado (Figura 2). Há a possibilidade de que estejam sendo remobilizados *pools* de N não acompanhados neste trabalho – RNA, por exemplo. A atividade de RNAses é bastante aumentada durante senescência (SMART, 1994) e, talvez, esse *pool* esteja sendo remobilizado anteriormente ao de proteínas.

Durante senescência, o total de proteínas de uma folha decresce progressivamente, como consequência da diminuição generalizada da taxa de síntese e do aumento na taxa de degradação (FELLER e FISCHER, 1994). Correlação positiva entre o aumento da atividade proteolítica durante senescência e a perda de proteína solúvel é freqüentemente citada (KAMACHI et al., 1991; LOHMAN et al., 1994), porém alguns autores já encontraram

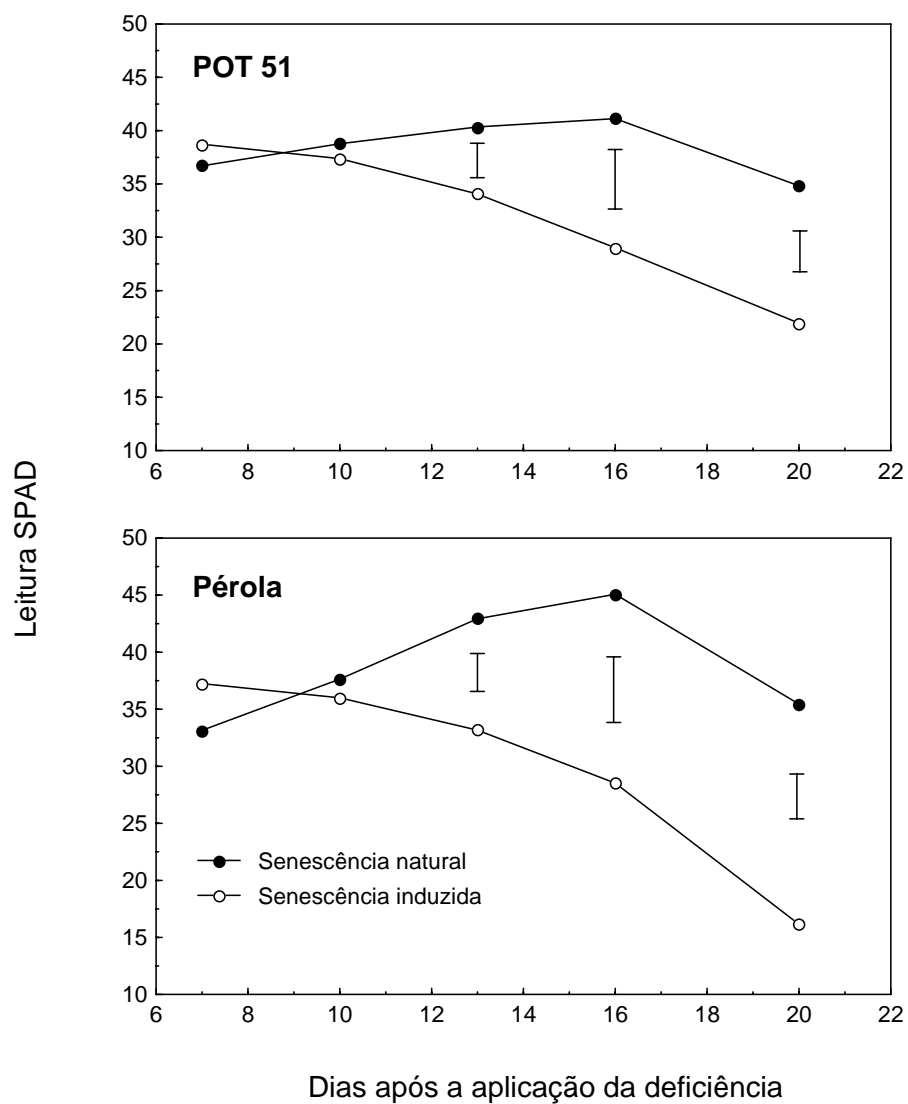


Figura 3 - Leitura SPAD em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P. As barras representam a diferença mínima significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

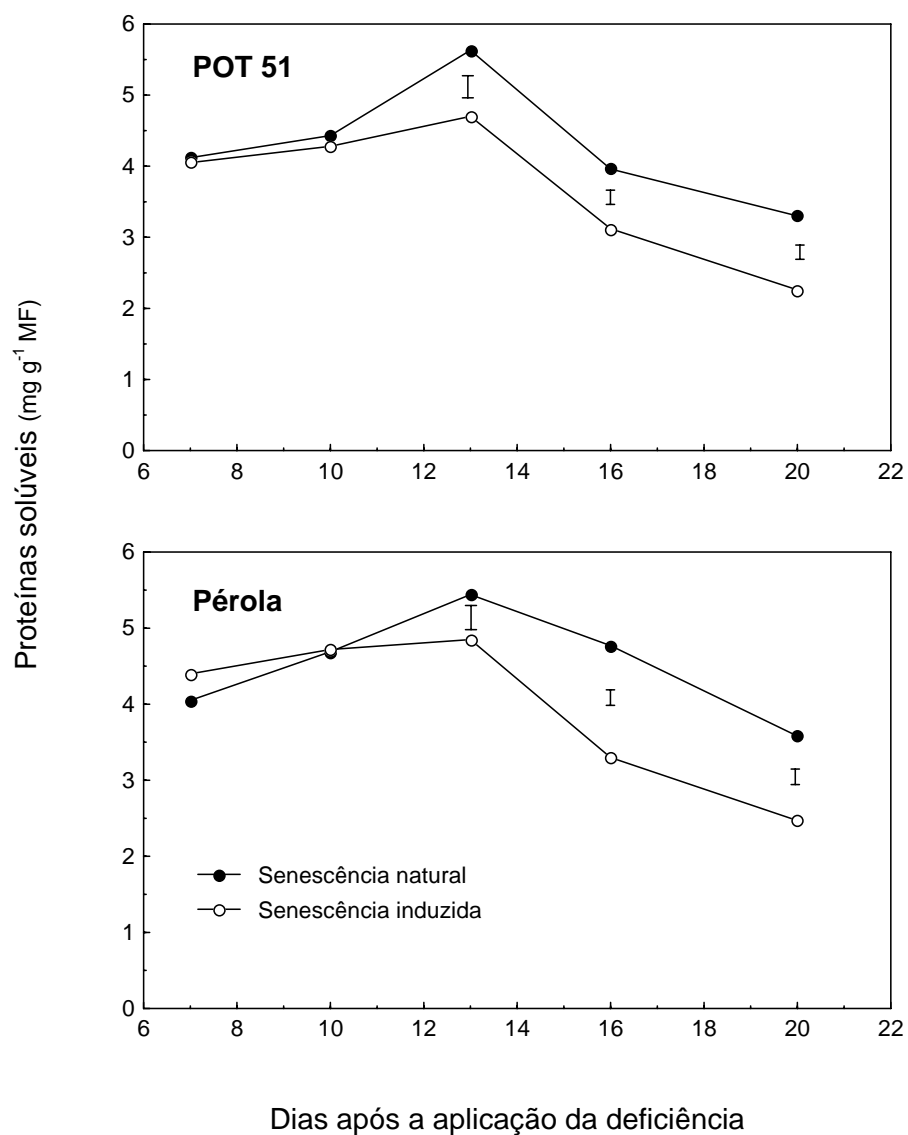


Figura 4 - Teor de proteínas solúveis em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P. As barras representam a diferença mínima significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

correlação negativa ou mesmo ausência de correlação (DALLING, 1987; HUFFAKER, 1990).

O teor de proteínas solúveis de uma folha reflete principalmente o nível de Rubisco. Proteínas do tilacóide, como as que se ligam às clorofilas a/b para formação dos complexos coletores de luz dos fotossistemas I e II, são pouco representadas por este parâmetro. Entretanto, essas proteínas contribuem com uma porcentagem considerável (cerca de 30%) do total de N foliar (MATILE, 1992), e sua remobilização de folhas senescentes é benéfica para a economia de N da planta. A degradação dessas e de outras proteínas do tilacóide é retardada em folhas senescentes de mutantes de *Festuca* incapazes de degradar clorofila, e é sugerido que as apoproteínas se tornem susceptíveis a enzimas proteolíticas quando não mais associadas a pigmentos (NOCK et al., 1992).

É possível que a deficiência de P tenha induzido, inicialmente, a degradação de proteínas do tilacóide numa proporção maior que a de Rubisco, como conseqüência da queda acelerada de clorofilas. E, assim, não se observa correlação entre os níveis de proteínas solúveis e os de clorofila nas duas primeiras semanas de indução. Também pode-se verificar paralelismo entre a queda nos níveis de clorofilas e de proteínas insolúveis durante senescência induzida por deficiência de P em milho (USUDA, 1995), e durante senescência natural em soja (JIANG et al., 1993).

As variações observadas nos teores de proteínas solúveis, nas duas cultivares, apresentam os mesmos perfis durante a senescência natural e a induzida por deficiência de P.

### **3.3. Atividades enzimáticas**

A senescência foliar se caracteriza pela transição da assimilação para a remobilização de N. A capacidade de assimilar nitrato é perdida, e a assimilação do amônio é direcionada para síntese de compostos que podem ser transportados para tecidos jovens, sementes ou órgãos de reserva (FELLER e FISCHER, 1994). Neste trabalho, observou-se, de maneira geral, queda progressiva na atividade das enzimas de redução do nitrato e assimilação do amônio durante senescência natural e induzida, nas duas cultivares.

### 3.3.1. Sintetase da glutamina

Em POT 51, a atividade de GS caiu mais rapidamente em senescência induzida, porém as perdas totais observadas durante senescência natural e induzida (65% e 61%, respectivamente) não diferiram significativamente (Figura 5). Em Pérola, os perfis da atividade de GS durante senescência natural e induzida foram os mesmos, mas a perda total observada durante senescência induzida (83%) foi significativamente maior que a observada durante senescência natural (66%).

O sistema GS/GOGAT é a principal via de assimilação do amônio em plantas superiores (SECHLEY et al., 1992). Durante senescência, a GS converteria glutamato e amônio (liberados principalmente pela hidrólise de proteínas) em glutamina, comumente encontrada na seiva do floema. Entretanto, queda na atividade de GS durante senescência, como a observada neste trabalho, é freqüentemente relatada na literatura (BERGER et al., 1985; PEETERS e van LAERE, 1992; CRAFTS-BRANDNER et al., 1998).

A separação e a quantificação das isoformas de GS foi investigada por *immunoblotting*. O anticorpo anti-GS<sub>2</sub> reconheceu tanto GS<sub>1</sub> quanto GS<sub>2</sub>. Um polipeptídeo predominante de aproximadamente 44 kD correspondente a GS<sub>2</sub> e uma banda suave de aproximadamente 40 kD, correspondente a GS<sub>1</sub>, foram detectados nos extratos de folhas. Durante senescência natural e induzida, pôde-se verificar uma redução nos níveis de GS<sub>2</sub>, porém não nos de GS<sub>1</sub> (Figura 6). Assim, a perda da atividade total de GS, observada na Figura 5, é causada pela queda no conteúdo de GS<sub>2</sub>.

Durante senescência, enzimas relacionadas à fotossíntese, como a GS<sub>2</sub> – responsável pela assimilação do amônio produzido por fotorrespiração -, perdem sua atividade paralelamente à queda dos níveis de Rubisco (LAST, 1993). Aqui, porém, a queda na atividade de GS precedeu a de proteína solúvel. É possível que essa perda de atividade esteja mais relacionada à taxa fotossintética (não acompanhada), que também pode ter apresentado queda anterior à de proteína solúvel, por remobilização das proteínas dos complexos coletores de luz.

O comportamento oposto é observado para GS<sub>1</sub>, cujos níveis aumentaram tanto durante a senescência natural quanto à induzida. Este dado

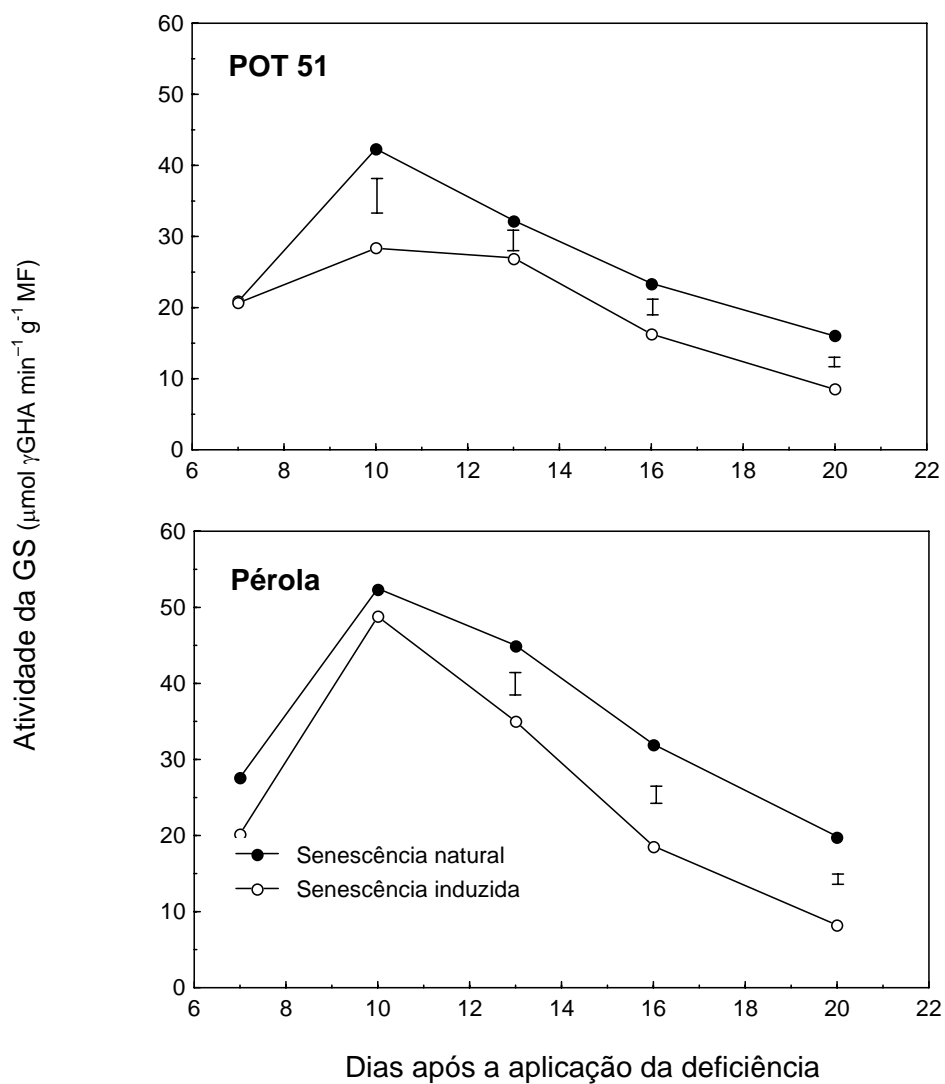


Figura 5 - Atividade da sintetase da glutamina (GS) em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P. As barras representam a diferença mínima significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

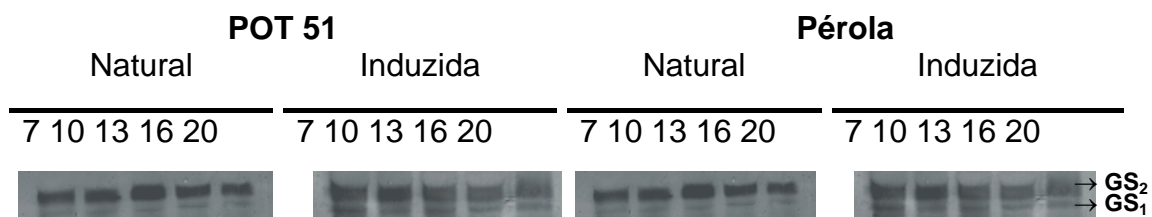


Figura 6 - Níveis dos polipeptídeos de GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub> durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Os números indicam dias após a aplicação da deficiência.

sugere que GS<sub>1</sub> possa ser a responsável pela síntese de glutamina para remobilização de N durante senescência em feijão. Esse papel já foi atribuído à enzima em tomate (PÉREZ-RODRÍGUEZ e VALPUESTA, 1996), arroz (KAMACHI et al., 1991 e KAMACHI et al., 1992), tabaco (EDWARDS et al., 1990) e soja (TIRADO et al., 1990).

Assim como os teores de proteínas solúveis, os perfis de atividade da GS, nas duas cultivares, apresentam as mesmas tendências durante a senescência natural e a induzida por deficiência de P.

### 3.3.2. Desidrogenase do glutamato

FRICKE e PAHLICH (1992) demonstraram a interferência de malato na determinação da atividade catabólica da GDH em extratos enzimáticos brutos, de forma que essa atividade é confiável somente quando medida em extratos dialisados. Assim, neste trabalho foi determinada apenas a atividade anabólica da GDH mitocondrial, dependente de NADH, que, segundo os mesmos autores, não é afetada pela possível presença de malato num extrato protéico bruto.

Em POT 51, a atividade da NADH-GDH permaneceu constante durante senescência natural e não houve efeito de tratamento. Em Pérola, a atividade variou significativamente, apresentando queda de 30% durante senescência natural e aumento de 37% durante senescência induzida (Figura 7). Aqui, diferente do observado em relação aos teores de proteínas solúveis e atividade da GS, os perfis de atividade da NADH-GDH apresentaram tendências opostas durante a senescência natural e a induzida por deficiência de P, na cultivar Pérola.

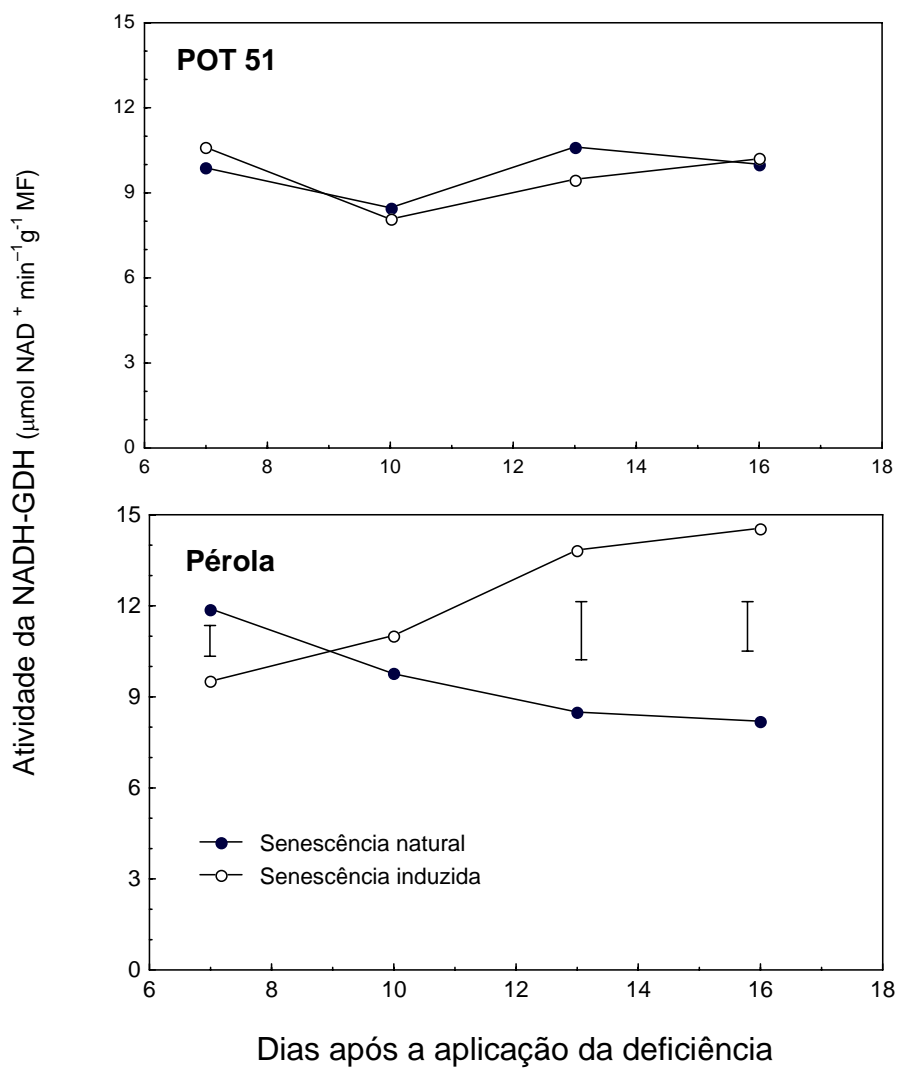


Figura 7 - Atividade da desidrogenase do glutamato mitocondrial (NADH-GDH) em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P. As barras representam a diferença mínima significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O papel desempenhado pela GDH não está bem estabelecido. Esta enzima é encontrada em todas as plantas superiores (já examinadas) e está freqüentemente presente em altos níveis em tecidos senescentes (LOYOLA-VARGAS e SANCHEZ DE JIMENEZ, 1984; PEETERS e van LAERE, 1992, ROBINSON et al., 1992; WATANABE et al. 1998). A GDH pode assimilar ou reassimilar amônio (num papel complementar ao do sistema GS/GOGAT) ou catalisar a oxidação do glutamato, suprindo esqueletos carbônicos para o ciclo de Krebs (SECHLEY et al., 1992). Esse papel catabólico implica numa importante função regulatória na integração dos metabolismos de C e N.

Durante senescência, têm-se relatos de aumento e de queda da atividade de NADH-GDH. O declínio gradual da atividade da NADH-GDH, observado em Pérola durante senescência natural, é comum quando se trabalha nessa condição (KAMACHI et al., 1991). Em contraste, um grande aumento é observado durante senescência de folhas destacadas (PEETERS e VAN LAERE, 1992 e WATANABE et al., 1998), o que sugere regulação distinta do metabolismo do C e do N nas duas situações. Por exemplo, o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$ , que provavelmente afeta o nível de NADH-GDH (SECHLEY et al., 1992), aumentou de 0,62 para 8,73  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF em folhas destacadas de *Lolium* senescendo no escuro (THOMAS, 1978). Entretanto, em folhas de arroz senescendo naturalmente, o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  foi de 0,28 e 0,5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF no início e final de senescência, respectivamente (KAMACHI et al., 1991).

ROBINSON et al. (1992) sugeriram que, em *Daucus carota*, a GDH responderia a mudanças no metabolismo de C e não de N. MAESTRI et al. (1991) demonstraram a repressão da síntese de GDH por glicose em *Asparagus officinalis* e *Nicotiana plumbaginifolia*, e um aumento significativo na atividade da GDH sob condição de privação de carbono ou energia.

Em feijão sob deficiência de P, a alocação preferencial de fotoassimilados para o sistema radicular causa uma diminuição nos teores foliares de fosfato inorgânico, hexoses e sacarose (CIERESZKO et al., 1996), o que poderia, talvez, explicar o aumento da atividade da NADH-GDH em Pérola durante senescência induzida. Em POT 51, a atividade não teria sido afetada porque, aparentemente, não houve aumento do desvio de fotoassimilados para o sistema radicular. CRAFTS-BRANDNER et al. (1998) também observaram

atividade constante da NADH-GDH ao longo da senescência natural e induzida por deficiência de N.

### 3.3.3. Redutase do nitrato

As atividades real e potencial da NR diminuíram durante senescências natural e induzida nas duas cultivares, e foram quase sempre mais altas em Pérola que em POT 51. As cultivares apresentaram atividades semelhantes, apenas nos estádios mais avançados de senescência (Figura 8).

O decréscimo da atividade da NR durante senescência é bem documentado (KONDRAT'EV e LEBEDINSKAYA, 1995; KENIS et al., 1992; KLEINHOFS e WARNER, 1990; STREIT e FELLER, 1982; FRANCO et al., 1979), porém os mecanismos que regulam essa queda não estão esclarecidos. KENIS et al. (1992) relatam manutenção nos níveis dos transcritos de NR, e sugerem uma regulação em nível de tradução ou pós-tradução. Entretanto, esses autores trabalharam com folhas destacadas supridas com nitrato, indutor da expressão gênica da NR (CRAWFORD, 1995), e sabe-se que durante senescência de folhas intactas, o influxo de nitrato é diminuído (FELLER e FISCHER, 1994, ANDREWS, 1986). A queda no suprimento de nitrato levaria à diminuição da expressão da enzima e conseqüentemente de sua atividade, o que está de acordo com as diferenças entre as atividades real e potencial observadas neste trabalho.

Durante senescência natural, foi observada limitação da atividade da NR por substrato (diferença entre as atividades real e potencial) durante as duas primeiras semanas de indução em POT 51 e em Pérola, durante todo o período de coletas (Figura 5). Aparentemente, há variação intra-específica na diminuição da absorção ou do influxo de nitrato na folha durante senescência. FRANCO et al. (1979) verificaram limitação da atividade da NR por substrato, em *Phaseolus vulgaris* cv Rico 23, somente a partir da semana que antecede a floração. É possível que a taxa transpiratória, e conseqüentemente o influxo de nitrato, tenha diminuído mais rapidamente em POT 51 que em Pérola.

Durante senescência induzida, não houve diferença significativa entre atividades real e potencial nas duas cultivares, indicando, nesta situação, limitação da atividade pela concentração da enzima.

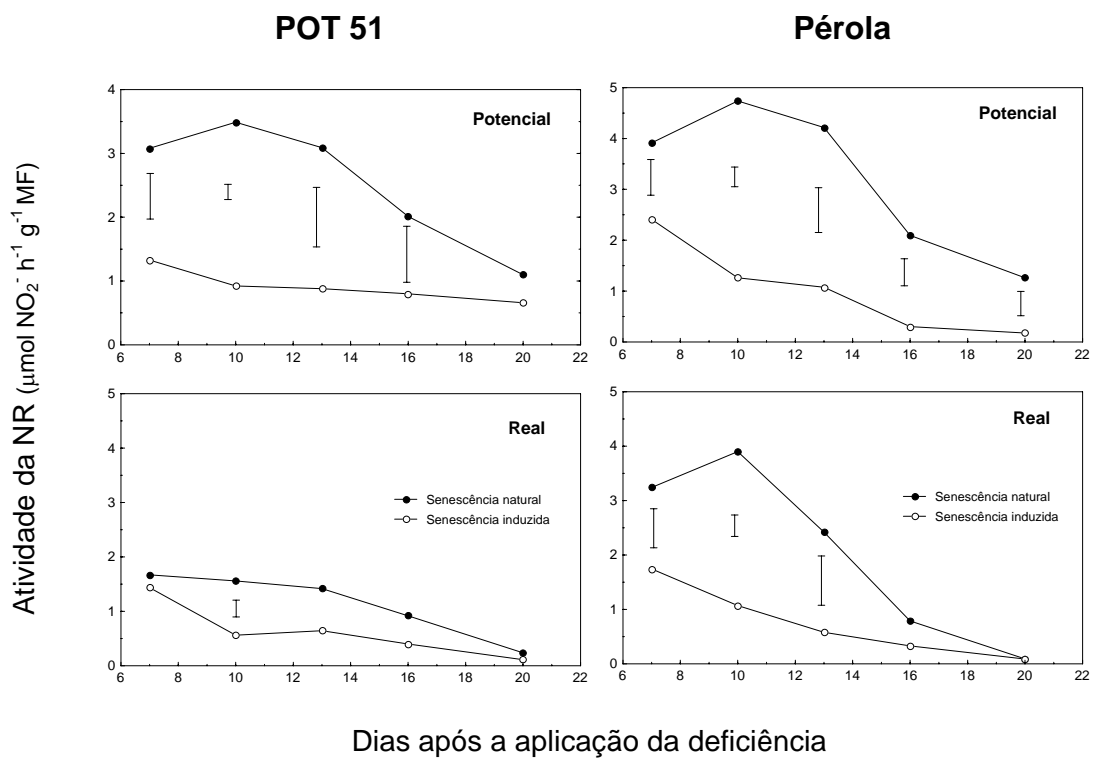


Figura 8 - Atividades real e potencial da redutase do nitrato (NR) em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris*, durante senescência foliar natural e induzida por deficiência de P. As barras representam a diferença mínima significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A atividade da NR também é influenciada por carboidratos. VICENTZ et al. (1996) relatam indução da expressão gênica da NR por glicose, frutose e sacarose. Adicionalmente, glicose-6-P e trioses-P inibem a fosforilação da NR, diminuindo, assim, o *pool* de enzima inativada (KAISER e HUBER, 1994). É provável que a maior queda na atividade real da NR, observada em Pérola durante senescência induzida, se deva em parte a uma diminuição nos teores desses carboidratos, devido ao desvio da partição de assimilados para o sistema radicular, em adição ao provável decréscimo da capacidade fotossintética e do influxo de nitrato. Em POT 51, a atividade teria sido menos afetada já que, aparentemente, não houve aumento do desvio de fotoassimilados para o sistema radicular.

Interessante ressaltar o paralelismo observado entre o teor de P e a atividade da redutase do nitrato (Figuras 1 e 8). Nas duas cultivares e nos tratamentos, os perfis da enzima aparentam maior correlação com os teores de P que com os de N. Talvez, o excesso de N disponível tenha possibilitado uma influência mais determinante de carboidratos sobre a atividade da enzima.

Como observado para os teores de proteínas solúveis e os perfis de atividade da GS, nas duas cultivares, as atividades real e potencial da NR apresentam as mesmas tendências durante as senescências natural e a induzida por deficiência de P.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de verificar se a deficiência de P é um sistema experimental adequado para o estudo de senescência, e se há uma redistribuição mais eficiente de P em cultivares melhoradas para menor requerimento, foi avaliado o metabolismo de N durante senescência foliar induzida por deficiência de P, em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. com diferentes requerimentos desse elemento.

Plântulas das cultivares POT 51 (baixo requerimento de P) e Pérola (alto requerimento de P) foram crescidas em solução de Hoagland (meia força) por dez dias e, em seguida, transferidas para soluções deficientes em P. Após uma semana de deficiência, foram medidos a cada três dias, no trifólio mais velho, os teores de clorofilas e de proteínas solúveis, e as atividades das enzimas redutase de nitrato (NR), sintetase da glutamina (GS) e desidrogenase do glutamato mitocondrial (NADH-GDH). Também foram determinados os níveis das isoformas citossólica (GS<sub>1</sub>) e cloroplastídica (GS<sub>2</sub>) da sintetase da glutamina, e os teores de N e P (medidos também no trifólio mais novo completamente expandido).

Após vinte dias de deficiência, a relação de massa fresca parte aérea/raiz não foi alterada em POT 51, e decresceu significativamente em Pérola. O crescimento de POT 51 mostrou-se mais susceptível à deficiência de P. É possível que essa variedade invista mais em estruturas reprodutivas que em crescimento, e assim mantenha sua produtividade em condições de baixo suprimento de P.

Nas duas cultivares, tanto em senescência natural quanto induzida, o nível de P dos trifólios jovens caiu paralelamente aos dos trifólios mais velhos. Foi observada remobilização de N, permanecendo constante o nível desse elemento nos trifólios jovens. Durante a senescência natural o teor de N caiu paralelamente ao de P. Porém, durante a senescência induzida, a queda, acelerada, no teor de P precedeu a de N, sugerindo o envolvimento do P na regulação da senescência mediante aceleração da remobilização de N.

Nas duas cultivares, a indução da senescência acelerou o início da perda de clorofilas, mas não da de proteínas solúveis. Pérola apresentou perda de clorofilas mais acentuada que POT 51. As variações observadas nos teores de proteínas solúveis, nas duas cultivares, apresentam os mesmos perfis durante a senescência natural e a induzida por deficiência de P.

As atividades da GS e da NR caíram progressivamente na presença e ausência de indução, nas duas cultivares. A queda da atividade de GS foi causada pela diminuição dos níveis de GS<sub>2</sub>. Os níveis de GS<sub>1</sub> aumentaram, sugerindo seu papel na remobilização de N durante senescência.

As atividades real e potencial de NR foram quase sempre mais altas em Pérola que em POT 51, tanto em senescência natural quanto induzida. Apenas nos estádios mais avançados, as cultivares apresentaram atividades iguais. Durante senescência natural, a atividade da NR apresentou limitação por substrato nas duas cultivares. Em senescência induzida, não houve diferença entre atividade real e potencial nas duas cultivares, indicando, nesta situação, limitação na concentração da enzima. Assim como os teores de proteínas solúveis, os perfis de atividade da GS e da NR, nas duas cultivares, apresentam as mesmas tendências durante a senescência natural e a induzida por deficiência de P.

Em Pérola, a atividade da NADH-GDH diminuiu durante a senescência natural e aumentou durante a induzida. Em POT 51, a atividade manteve-se constante e não houve efeito de tratamento.

Não ficou claro se POT 51, cultivar melhorada para menor requerimento de P, remobiliza esse elemento de maneira mais eficiente que Pérola (alto requerimento de P). Aparentemente não, já que as plantas de POT 51 não apresentaram senescência foliar anterior às de Pérola, como esperado no caso de maior capacidade de remobilização de P.

A aplicação da deficiência de P mostrou-se um sistema adequado para o estudo do metabolismo de N durante a senescência foliar em feijão. Nas duas cultivares, os teores de proteínas solúveis, a atividade total da GS e as atividades real e potencial da NR apresentaram perfis similares aos observados durante a senescência natural. Sugere-se um menor suprimento de N (o que possivelmente levaria a maiores taxas de remobilização e conseqüentemente a respostas mais diferenciadas), um período mais longo de acompanhamento e a inclusão de parâmetros relacionados ao metabolismo de C (presença e atividade de Rubisco, taxa fotossintética, conteúdo de hexoses fosfatadas etc.), uma vez que o comportamento diferencial (quase oposto) da NADH-GDH é um indicador de que a deficiência de P pode alterar o curso e a extensão de eventos relacionados ao metabolismo de C durante a senescência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKEN, A.K., MACDUFF, J.H., COLLINSON. Dynamics of nitrogen remobilization in defoliated *Phleum pratense* and *Festuca pratensis* under short and long photoperiods. **Physiol. Plant.**, v.103, p.426-436, 1998.
- BECKER, W., APEL, K. Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. **Planta**, v.189, p.74-79, 1993.
- BERGER, M.G., WOO, K.C., WONG, S.C., FOCK, H.P. Nitrogen metabolism in senescent flag leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the light. **Plant Physiol.**, v.78, p.779-783, 1985.
- BONSER, A.M., LYNCH, J., SNAPP, S. Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytol.**, v.132, p.281-288, 1996.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-258, 1976.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **J. Exp. Bot.**, v.307, p.181-199, 1997.
- CAKMAK, I., HENGELER, C., MARSCHNER, H. Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. **J. Exp. Bot.**, v.278, p.1245-1250, 1994.
- CIERESZKO, I., GNIAZDOWSKA, A., MIKULSKA, M., RYCHTER, A.M. Assimilate translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. **J. Plant Physiol.**, v.149, p.343-348, 1996.

- CRAFTS-BRANDNER, S.J. Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean. **Plant. Physiol.**, v.102, p.1128-1132, 1992.
- CRAFTS-BRANDNER, S.J., HÖLZER, R., FELLER, U. Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. **Physiol. Plant.**, v.102, p.192-200, 1998.
- CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **Plant Cell**, v.7, p.859-868, 1995.
- DALLING, M.J. Proteolytic enzymes and leaf senescence. In *Plant senescence: its biochemistry and physiology*. In: THOMSOM, W.W., NOTHANGEL, E.A., HUFFAKER, R.C. (Eds.), Rockville: Eds. ASPP, 1987, p.54-70.
- DOMINGUES, J.L. **Crescimento e características bioquímicas e fotossintéticas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob deficiência de nitrogênio e fósforo**. Viçosa-MG: UFV, 1998. 76p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- EDWARDS, J.W., WALKER, E.L., CORUZZI, G.M. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.3459-3463, 1990.
- FELLER, U., FISCHER, A. Nitrogen metabolism in senescencing leaves. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.13, p.241-273, 1994.
- FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v.66, p.75-400, 1925.
- FRANCO, A.A., PEREIRA, J.C., NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiol.**, v.63, p.421-424, 1979.
- FRICKE, W., PAHLICH, E. Malate: a possible source of error in the NAD glutamate dehydrogenase assay. **J. Exp. Bot.**, v.43, p.1515-1518, 1992.
- GAN, S., AMASINO, R.M. Making sense of senescence. **Plant Physiol.**, v.113, p.313-319, 1997.
- HAYAKAWA, T., KAMACHI, K., OIKAWA, M., OJIMA, K., YAMAYA, T. Response of glutamine synthetase and glutamate synthase isoforms to nitrogen sources in rice cell cultures. **Plant Cell Physiol.**, v.31, p.1071-1077, 1990.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Univ. Calif. Agric. Expt. Stn. Circ.**, v.347, p.1-32, 1950.

- HUFFAKER, R.C. Proteolytic activity during senescence of plants. **New Phytol.**, v.116, p.199-231, 1990.
- JACOB, J., LAWLOR, D.W. *In vivo* photosynthetic electron transport does not limit photosynthetic capacity in phosphate-deficient sunflower and maize leaves. **Plant Cell Environ.**, v.16, p.785-795, 1994.
- JIANG, C.-Z., RODERMEL, S.R., SHIBLES, R.M. Photosynthesis, Rubisco activity and amount and their regulation by transcription in senescencing soybean leaves. **Plant Physiol.**, v.101, p.105-112, 1993.
- JUNGHANS, T.G., MOSQUIM, P.R. Atividade da sintetase da glutamina e sintase do glutamato em explantes de frutos de soja sob diferentes fontes de nitrogênio. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.7, p.64-67, 1995.
- KAISER, W.M., HUBER, S.C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiol.**, v.106, p.817-821, 1994.
- KAMACHI, K., YAMAYA, T., MAE, T., OJIMA, K. A role for glutamine synthetase in remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. **Plant Physiol.** v.96, p.411-417, 1991.
- KAMACHI, K., YAMAYA, T., MAE, T., OJIMA, K. Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. **Plant Physiol.**, v.99, p.1481-1486, 1992.
- KENIS, J.D., SILVENTE, S.T., LUNA, C.M., CAMPBELL, W.H. Induction of nitrate reductase in detached corn leaves: the effect of the age of the leaves. **Physiol. Plant.**, v.85, p.49-56, 1992.
- KLEINHOF, A., WARNER, R.L. Advances in nitrate assimilation. In *The Biochemistry of plants 16, Intermediary nitrogen metabolism*. In: MIFLIN, B.J., LEA, P.J. (Eds). San Diego: Academic Press, 1990, p.89-120.
- KONDRAT'EV, M.N., LEBEDINSKAYA, S.O. Nitrate reductase and protease activity in wheat during reproductive growth. **Russ. J. Plant Physiol.**, v.42, p.350-357, 1995.
- KOZOVITS, A.R. **Assimilação de nitrogênio em espécies lenhosas de cerrado**. Brasília-DF: UnB, 51p. 1997 Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Brasília, 1997.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LANG, C.A. Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological material. **Anal. Chem.**, v.30, p.1692-1693, 1958.

- LAST, R.L. The genetics of nitrogen assimilation and aminoacid biosynthesis in flowering plants: progress and prospects. **Int. Rev. Cytol.**, v.143, p.297-330, 1993.
- LOHMAN, K.N., GAN, S., JOHN, M.C., Amasino, R.M. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Physiol. Plant.**, v.92, p.322-328, 1994.
- LOYOLA-VARGAS, V.M., SANCHEZ DE JIMENEZ, E. Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. **Plant Physiol.**, v.76, p.536-540, 1984.
- MAESTRI, E., RESTIVO, F.M., GULLI, M., TASSI, F. Glutamate dehydrogenase regulation in callus culture of *Nicotiana plumbaginifolia*: effect of glucose feeding and carbon source starvation on the isoenzymatic pattern. **Plant Cell Environ.**, v.14, p.613-618, 1991.
- MATILE, P. Chloroplast senescence. In: BAKER, N.R., THOMAS, H. (Eds.) **Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants**. Elsevier: Amsterdam, 413-440, 1992.
- NELSON, D.W., SOMMERS, L.E. Determination of total nitrogen in plant material. **Agron. J.**, v. 65, p.109-112, 1973.
- NOCK, L.P., ROGERS, L.J., THOMAS, H. Metabolism of protein and chlorophyll in leaf tissue of *Festuca pratensis* during chloroplast assembly and senescence. **Phytochem.**, v.31, p.1465-1470, 1992.
- OCHS, G., SCHOK, G., Wild, A. Purification and characterization of glutamine synthetase isoenzymes from leaves and roots of *Brassica napus* (L.). **J. Plant Physiol.**, v.147, p.1-8, 1995.
- PEETERS, K.M.U., van LAERE, A.J. Ammonium and aminoacid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. **Physiol. Plant.**, v.84, p.243-249, 1992.
- PÉREZ-RODRÍGUES, J., VALPUESTA, V. Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves. **Physiol. Plant.**, v.97, p.576-582, 1996.
- PLENISCAR, M., KADSTORI, R., PETROVIC, N., PANKOVIC, D. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. **J. Exp. Bot.**, v.45, p.919-924, 1994.
- ROBINSON, S.A., STEWART, G.R., PHILLIPS, R. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitations and protein

- catabolism in carrot cell suspension cultures. **Plant Physiol.**, v.98, p.1190-1195, 1992.
- SECHLEY, K.A., YAMAYA, T., OAKS, A. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. **Int. Rev. Cytol.**, v.134, p.85-163, 1992.
- SMART, C.M. Gene expression during leaf senescence. **New Phytol.**, v.126, p.419-448, 1994.
- STREIT, L., FELLER, U. Changing activities of nitrogen-assimilation enzymes during growth and senescence of dwarf beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Z. Pflanzenphysiol.**, v.108, p.273-281, 1982.
- THOMAS, H. Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. **Planta**, v.142, p.61-169, 1978.
- TIRADO, J.-L., CONÉJÉRO, G., ROBIN, P. Comparaison des activités glutamine synthétase, glutamate déshydrogénase et nitrate réductase chez *Glycine max.* Effet l'obscurité sur la première feuille trifoliée. **Plant Physiol. Biochem.**, v.28, p.251-257, 1990.
- USUDA, H. Phosphate deficiency in maize V. Mobilization of nitrogen and phosphorus within shoots of young plants and its relationship to senescence. **Plant Cell Physiol.**, v.36, p.1141-1149, 1995.
- USUDA, H., SHIMOGAWARA, K. Phosphate deficiency in maize VI. Changes in the two-dimensional electrophoretic patterns of soluble proteins from second leaf blades associated with induced senescence. **Plant Cell Physiol.**, v.36, p.1149-1155, 1995.
- VICENTZ, M., MOUREAUX, T., LEYDECKER, M.T., VAUCHEREET, H., CABOCHE, M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbagifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant J.**, v.3, p.1027-1035, 1993.
- WATANABE, M., KAWASAKI, H., ITHO, Y., WATANABE, Y. Senescence development of *Brassica napus* leaf protoplast during isolation and subsequent culture. **J. Plant Physiol.**, v.152, p.487-493, 1998.