

1. INTRODUÇÃO

Entre os fatores que afetam a produtividade do milho no Brasil está o atraso na colheita, baixa população de plantas, falta de tecnologia e de insumos. Como fator preponderante responsável pelos baixos índices de produtividade, destaca-se a inexistência de programas de adubação e também impedimentos físico-químicos que ocorrem nos solos gaúchos não permitindo o pleno desenvolvimento radicular. Somando-se a isso, outros fatores de difícil controle, podem ser minimizados utilizando-se informações meteorológicas e zoneamentos agrícolas, possibilitando maior segurança para o investimento na cultura. Um ponto relevante é a disponibilidade de nutrientes para as quantidades extraídas pelo milho. Se atendidas estas necessidades, já se tem a base para alcançar altas produtividades (Teixeira, 2004). Para atingir altos níveis de produtividade, a dose de nitrogênio (N) aplicada e o momento da aplicação definem o sucesso da adubação nitrogenada.

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade final das culturas, estando presente em diversas formas na biosfera.

Embora se encontre cerca de 78% na forma molecular na atmosfera, esse grande reservatório não está diretamente disponível para os seres vivos. Para ser absorvido é necessária a quebra de uma ligação tripla covalente entre dois

átomos de N. A incorporação de nitrogênio em compostos orgânicos acontece de modo intenso em células de raízes jovens em crescimento e as principais fontes de nitrogênio disponíveis para as plantas são o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+).

O nitrato absorvido é assimilado nas raízes ou na parte aérea, dependendo da sua disponibilidade, da espécie vegetal e do estágio de desenvolvimento da planta. No processo de assimilação o nitrato é reduzido a nitrito (NO_2^-) no citosol pela enzima redutase do nitrato (NR); enzima essa considerada chave na assimilação do nitrato, sendo, posteriormente, o nitrito reduzido a amônio nos plastídeos da raiz ou nos cloroplastos pela enzima nitrito redutase (Kleinhofs & Warner, 1990). A amônia é então assimilada nos aminoácidos glutamato e glutamina, os quais servem para translocar nitrogênio orgânico desses locais de produção para locais onde será consumido (Salisbury, 1992).

Deve-se destacar então, a importância da reação da enzima NR e sua possível correlação com o crescimento e produtividade, e eficiência na absorção do nitrogênio pelas plantas em geral, e para o milho em especial durante o estágio vegetativo. O nitrato, a luz e os carboidratos interferem na NR em nível de transcrição e tradução (Sivasankar & Oaks, 1996). Em plântulas de cevada, o mRNA da enzima foi detectado aproximadamente 40 minutos após a aplicação do nitrato, sendo os níveis máximos obtidos em três horas. Ao contrário do rápido acúmulo do mRNA, houve um incremento gradual linear na atividade da NR, refletindo a síntese mais lenta da proteína. Além disso, a proteína sofre também uma regulação pós-tradução, envolvendo uma fosforilação reversível. A luz e os níveis de carboidratos estimulam a proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos de serina na proteína redutase do nitrato, promovendo a ativação da enzima. Agindo na direção inversa, o escuro e íons minerais como o Mg^{2+} estimulam a proteína cinase, a qual fosforila os mesmos resíduos de serina, inativando a redutase do nitrato (Kaiser *et al.*, 2000).

A regulação da atividade da redutase do nitrato por meio da fosforilação possibilita um controle mais rápido do que o mediado pela síntese ou degradação da enzima, minutos ao invés de horas, respectivamente (Taiz & Zeiger, 1998).

O ensaio *in vivo* da atividade da redutase do nitrato tem sido amplamente utilizado como indicador do metabolismo do N em plantas. Muitos autores consideram essa metodologia como a mais adequada para a comparação da atividade dessa enzima entre espécies diferentes ou entre tratamentos distintos (Crafts-Brandner & Harper, 1982; Cairo **et al.**, 1994; Singh, 1994).

O conhecimento das formas de absorção, assimilação e transporte do nitrogênio em plantas de milho é devesas importante na avaliação do seu comportamento fisiológico nos diferentes estádios de desenvolvimento, desde a germinação até a produção da espiga.

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência de fontes de nitrogênio e luz sobre a atividade da redutase do nitrato e sua associação com a assimilação do N, alterações bioquímicas e o crescimento de plantas jovens de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo

O presente experimento foi conduzido em laboratório e em casa de vegetação climatizada com temperatura média de 30 ± 2 °C, na Universidade Federal de Pelotas.

Foram utilizadas sementes de milho, variedade BRS 3060 km de uso comum no Rio Grande do Sul e fornecidas pela Embrapa Clima Temperado (Estação Terras Baixas). As sementes de milho previamente tratadas foram semeadas em vasos de polietileno, não perfurados, com capacidade para 1,5 kg, contendo areia lavada como substrato e com 3 sementes por vaso. Foi realizada assepsia prévia dos vasos com hipoclorito de sódio a 5% durante uma hora. Aos três dias procedeu-se o desbaste deixando-se apenas uma planta, das três semeadas inicialmente em cada vaso. Essas plantas foram irrigadas apenas com água desmineralizada nos primeiros 10 dias após a semeadura. Em seguida foram iniciados os tratamentos que consistiram do controle (sem nitrogênio), nitrato, amônio e nitrato associado com amônio em concentração única de 5 mM. Como fonte de nitrato utilizou-se nitrato de potássio (KNO_3^-), de amônio, o sulfato de amônio (NH_4)₂SO₄ e nitrato em associação com amônio, o nitrato de amônio (NH_4NO_3). As soluções com nitrogênio (N) foram aplicadas aos 12, 16, 20, 24 e 28 dias após a emergência e entre essas aplicações utilizou-se soluções completas de nutrientes sem fonte de N (Hoagland e Arnom, 1938). No 28º dia após a

emergência (DAE) as plantas foram transferidas ao laboratório de Nutrição mineral do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas e separadas em dois lotes, sendo que um deles permaneceu 48 horas sob total escuridão e o outro sob luz contínua. Nos 30 DAE, foram feitas as análises dos parâmetros de crescimento e determinações bioquímicas.

2.2. Análise das características de crescimento

As características de crescimento avaliadas foram a altura das plantas, número de folhas, área foliar, massa seca da parte aérea, da raiz e massa seca total. As plantas foram cuidadosamente retiradas dos vasos sendo separadas em parte aérea e raiz para a determinação da massa fresca da parte aérea, raiz e total, além da medição da área foliar de cada planta em aparelho de medir área (modelo Li-Cor 3000).

Retiraram-se e pesaram-se amostras de folhas completamente expandidas, sendo as mesmas acondicionadas em recipientes adequados e mantidas à temperatura de 4°C, para posteriores análises bioquímicas. O procedimento de retirada de amostras, pesagem e acondicionamento foram feitos de forma semelhante nas raízes. Em seguida, o material vegetal restante foi devidamente acondicionado e transferido para estufa regulada para 75°C, onde permaneceu até atingir massa constante, para determinação da massa seca da parte aérea, da raiz e total de cada planta.

2.3. Análises bioquímicas

A extração de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides foi efetuada em 100 mg de material fresco utilizando acetona (Arnon 1945) e os cálculos realizados segundo Lichtenthaler (1987). As absorvâncias foram lidas a 470, 647 e 663 nm, sendo que a soma das clorofilas *a* e *b* representa o resultado da clorofila total.

Os resultados, expressos em $\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$, com pesos e volumes devidamente corrigidos, foram determinados por meio das seguintes equações:

Clorofila a: $12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$

Clorofila b: $21,50 A_{647} - 5,10 A_{663}$

Carotenóides: $1000 A_{470} - 1,82 [Cl a] - 85,02 [Cl b]/198$

Os carboidratos solúveis totais foram determinados em amostras de 100 mg de folhas e raízes secas pelo método da antrona (Clegg, 1956).

Para a extração da proteína solúvel foram maceradas amostras de 100 mg de material seco em hidróxido de sódio 0,1M e a quantificação foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

A atividade da enzima redutase do nitrato foi determinada pela metodologia de Campbell *et al.* (1996), quantificada em 100 mg de amostra fresca de folhas e raízes.

2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

Os tratamentos, repetidos seis vezes, foram dispostos inteiramente ao acaso, e os resultados obtidos, sujeitos à análise de variância e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se um esquema fatorial de 4x2, sendo quatro fontes de nitrogênio [0;KNO₃, 5mM; (NH₄)₂SO₄, 5mM; NH₄NO₃, 5mM] e duas condições de luminosidade (escuridão plena e luz contínua por 48 horas).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e luz sobre o crescimento de plantas jovens de milho

Verificou-se aumento significativo na área foliar (Tabela 1), número de folhas (Tabela 2), altura de plantas (Tabela 3), e matéria seca total (Tabela 6) das plantas mantidas no claro, quando receberam fontes de nitrogênio (N), sendo esse aumento independente de ter sido nitrato, amônio ou as duas fontes associadas.

Nota-se que ao fornecer nitrato isolado como fonte de nitrogênio houve um aumento de 67% na área das folhas em relação ao controle sob condições de luminosidade, sendo este o maior incremento observado na área foliar. Porém, entre as fontes de N testadas, o nitrato não revela diferença significativa das mesmas, pois todas proporcionaram aumentos consideráveis e semelhantes na área foliar das plantas de milho. Quando analisadas no escuro, embora as fontes não apresentassem diferenças entre si, todas superaram o controle, sendo que a associação de nitrato com amônio mostrou-se 155% mais eficiente que o controle (Tabela 1), demonstrando, possivelmente, um efeito sinérgico.

Segundo Nabinger (1997), fatores como as deficiências de água e de nitrogênio são os mais comuns a afetar a área foliar das plantas.

O crescimento, bem como a composição das folhas é substancialmente afetado pelo suprimento em nitrogênio (Nelson e Dengler, 1997). O fornecimento desse mineral essencial é crucial para a produção de proteínas

estruturais e àquelas envolvidas na biossíntese de parede celular e citoesqueletos, indispensáveis à expansão celular (Lawlor **et al.**, 1988). Isso pode explicar o aumento na área foliar nos tratamentos com nitrogênio (Tabela 1).

TABELA 1 - Área foliar média ($\text{mm}^2 \text{ planta}^{-1}$) de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
Claro	7846B*	13136A	12803A	13048A
Escuro	6703B	11299AB	15469A	17137A

*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A formação de grãos na cultura do milho está estreitamente relacionada com a translocação de açúcares (Crawford **et al.**, 1982) e de nitrogênio (Karlen **et al.**, 1988) de órgãos vegetativos, principalmente das folhas, para os grãos. Assim, é evidente a relação entre a área foliar e a produção de grãos. Isso ocorre basicamente pela maior capacidade que as folhas bem nutridas em nitrogênio têm de assimilar CO_2 e sintetizar carboidratos durante a fotossíntese, resultando em maior acúmulo de biomassa.

O estado nutricional das plantas, como também as condições do ambiente como temperatura, luminosidade, umidade do solo, aliados às características genéticas das plantas e manejo, são ferramentas fundamentais para o processo de formação e manutenção dos tecidos vegetais e por consequência da área foliar. Sob condições de deficiência de nitrogênio é retardada a divisão celular nos pontos de crescimento, o que resulta em uma redução da área foliar e no tamanho da planta (Arnon, 1975), com reflexos no rendimento da cultura.

O nitrato e a sua associação com o amônio aumentaram significativamente ($P \leq 0,05$) o número de folhas na luz. Entretanto, em condições de escuro não houve diferenças entre as fontes de nitrogênio (Tabela 2).

TABELA 2 - Número médio de folhas das plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺
Claro	4,7C*	5,7AB	5,0BC	6,0A
Escuro	5,3A	5,8A	5,8A	6,0A

*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tanto no claro quanto no escuro as plantas não apresentaram diferenças relevantes na altura da parte aérea quando submetidas ao nitrato, amônio e as fontes associadas, mas todas se mostraram mais eficientes que o controle (Tabela 3).

TABELA 3 - Altura de plantas (mm) de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺
Claro	265B*	403A	377A	387A
Escuro	265B	383A	410A	412A

*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A matéria seca da parte aérea não diferiu estatisticamente entre as três fontes de nitrogênio, sendo que todas se sobressaíram em relação ao controle, porém sem influência entre luz e escuro (Tabela 4). Isto demonstra que, independente da fonte de nitrogênio utilizada a concentração 5,0 mM foi adequada para suprir as plantas no elemento mineral e garantir seu crescimento. Esse fato é confirmado por outros autores em estudos semelhantes como os conduzidos por Li e Oaks (1993). Sobre o efeito do nitrato sobre o crescimento de plântulas de milho, onde ocorreu pequeno acúmulo de massa seca na parte aérea das plântulas mesmo quando foram cultivadas em meio sem nitrato. Com o acréscimo de 5,0 mM de nitrato ocorreu incremento de 90% na massa seca da parte aérea, semelhante, portanto, ao incremento de 95% observado no presente experimento relacionando o controle sem nitrogênio com a adição de 5,0 mM de NO_3^- no claro (Tabela 4). O incremento na massa seca da raiz foi menor, tanto no trabalho citado (Li e Oaks, 1993) quanto no presente trabalho (Tabela 5). Os autores retratam que as melhores concentrações de nitrato para o crescimento das raízes situam-se entre 1 a 10 mM, em relação a 0,0; 20 ou 50 mM de NO_3^- . Para o crescimento da parte aérea, as concentrações de 5 e 10 mM foram melhores em relação às outras concentrações. No presente trabalho o fornecimento de 5,0 mM de nitrogênio proporcionou um incremento na massa seca, principalmente na parte aérea. O crescimento das raízes foi mais sensível a variações da fonte nitrogenada bem como da associação entre diferentes fontes de nitrogênio como nitrato e amônio.

O crescimento radical de plantas de arroz, contribuem de forma satisfatória ao aumentarem a área das raízes e matéria seca das raízes quando cultivadas por 25 dias com 7 mM de nitrogênio (Shigaki *et al.*, 2001). É provável que o incremento no crescimento das raízes seja consequência do aumento do número de sítios de absorção, além de proporcionar maior exploração de volume de solo (Fontes e Barber, 1984).

TABELA 4 - Massa seca da parte aérea (g) de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺
Claro	0,23B*	0,45A	0,32AB	0,39A
Escuro	0,20B	0,37A	0,43A	0,42A

*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com Marschner (1995), o suprimento de nutrientes minerais pode afetar fortemente o crescimento das raízes, sua morfologia e distribuição no substrato. O mesmo autor acrescentou ainda que o efeito é mais marcante particularmente para o fornecimento de nitrogênio e também que o efeito desse nutriente no aumento da área das raízes é freqüentemente mais distinto que o suprimento de amônio em relação ao nitrato.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Carelli *et al.* (1996) em plantas de girassol, que, quando cultivadas com diferentes níveis de nitrato apresentaram aumento da massa seca total das plantas até a concentração de 22,1 mM de nitrato na solução nutritiva, decrescendo, com níveis maiores de NO₃⁻. Aumento esse decorrente dos acréscimos verificados nas massas secas de folhas e hastes.

No presente trabalho, em condições de luminosidade, as fontes nitrogenadas aplicadas não influenciaram o aumento da massa seca de raízes, bem como o tratamento na ausência de luz associado à aplicação de nitrato e amônio de forma conjunta (Tabela 5).

TABELA 5 - Massa seca das raízes (g) de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺
Claro	0,44A*	0,54A	0,55A	0,42A
Escuro	0,36B	0,47AB	0,56A	0,32B

*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em vista dos resultados obtidos, com relação a massa seca total, sob condições de luz, todas as fontes se mostraram com semelhante eficiência e valores superiores ao controle. Na ausência da luz, nitrato e amônio isolados mostraram serem mais eficientes que o controle e também quando utilizados em conjunto (Tabela 6).

TABELA 6 - Massa total (g) de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺
Claro	0,67B*	0,98A	0,87AB	0,81AB
Escuro	0,55C	0,84AB	0,99A	0,75BC

*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Há uma relação direta entre fertilização com nitrogênio e a taxa de crescimento e produtividade de plantas de milho. Entretanto, estudos têm

mostrado que os diferentes genótipos apresentam variações na capacidade de absorver o nitrogênio do solo e na utilização de N absorvido para síntese de componentes celulares (Costa **et al.**, 2002). Os resultados aqui obtidos não tem caráter conclusivo e outros estudos devem ser feitos comparando diferentes cultivares no que diz respeito à eficiência na absorção e utilização do N disponível.

A absorção de N depende de sua concentração na solução do solo, do volume de solo explorado pelas raízes e de sua eficiência em absorvê-lo (Lawlor, 2002). Nenhum desses fatores foi limitante para as plantas tendo em vista que, em geral, todas as características de crescimento analisados tiveram resultados positivos comparando-se o meio de cultivo sem nitrogênio com a presença desse mineral, independente da forma e associação como foi fornecido.

3.2. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e luz sobre alterações bioquímicas em plantas jovens de milho

3.2.1. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e luz sobre o teor de pigmentos fotossintéticos

O teor de clorofila *a* (Tabela 7) em condições de luminosidade, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Já no escuro, os tratamentos melhores foram nitrato e amônio isolados em relação as fontes associadas e ao controle. A melhor fonte foi o amônio isolado, apresentando uma diferença de 144% em relação ao controle. Dentre as fontes de nitrogênio, o único tratamento que apresentou diferenças significativas entre os regimes de luz foi a associação de nitrato e amônio.

O teor de clorofila *b* foi significativamente maior com amônio em relação ao controle, porém não diferindo dos demais tratamentos. O nitrato e as fontes associadas não apresentaram diferenças significativas entre si, sobressaindo-se apenas sobre a testemunha, em condições de luminosidade. Na ausência de luz, os tratamentos com nitrato e amônio de forma isolada, apresentaram melhores resultados que o controle e as fontes associadas, mas ambos não apresentaram

diferenças entre si. Não houve interação entre os fatores fontes de nitrogênio e regime de luz (Tabela 8).

TABELA 7 - Teor de clorofila *a* ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de plantas de milho cultivado com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	controle	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
Claro	2,8Ba*	4,3ABa	5,0Aa	5,5Aa
Escuro	2,5Ba	4,7Aa	6,1Aa	2,2Bb

*Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas, na linha, e minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 8 - Teor de clorofila *b* ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de plantas de milho cultivado com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
Claro	1,14B*	1,71AB	3,33A	1,98AB
Escuro	1,12B	1,97A	2,52A	0,90B

*Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas, na linha, e minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A relação clorofila *alb* não apresentou grandes alterações em relação às diferentes fontes de nitrogênio e regimes de luz (Tabela 9), apesar de que na ausência de nitrogênio, os teores de clorofila *a* (Tabela 7) e clorofila *b* (Tabela 8) sempre foram inferiores aos tratamentos com nitrogênio. A relação clorofila *alb* não é afetada pelo suprimento de nitrogênio, apesar do decréscimo nos teores dos pigmentos fotossintéticos, em virtude da planta se adaptar à disponibilidade de

nitrogênio (Lawlor, 2002) bem como a diferentes fontes do mineral essencial, como observado no presente experimento (Tabela 9).

TABELA 9 - Relação entre os teores de clorofila *a* e *b* ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de plantas de milho cultivado com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
Claro	2,4	2,5	1,7	2,7
Escuro	2,2	2,4	2,4	2,4

Os valores de clorofila total foram influenciados de forma semelhante aos de clorofila *a*, quando em condições de luminosidade, não havendo diferença significativa entre os tratamentos com amônio e as fontes associadas, mas sendo maiores do que os do controle. No escuro, os tratamentos melhores foram nitrato e amônio isolados em relação às fontes associadas e ao controle. Entre as fontes de nitrogênio, o único tratamento que apresentou diferenças significativas entre os regimes de luz foi a associação de nitrato e amônio (Tabela 10).

Ao que parece, o amônio (isolado ou associado ao nitrato) foi uma fonte eficiente para a síntese de pigmentos fotossintéticos. O amônio absorvido, pode ter sido incorporado em ácidos orgânicos, dando origem aos aminoácidos a partir de reações subsequentes catalisadas pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase. Além de presente em biomoléculas fundamentais como proteínas e aminoácidos, o N é constituinte das clorofilas (Mengel & Kirby, 1987).

TABELA 10 - Teor de clorofila Total ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
Claro	3,95Ba*	6,11ABa	8,36Aa	7,54Aa
Escuro	3,68Ba	6,69Aa	8,69Aa	3,14Bb

*Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas, na linha, e minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A estrutura das clorofilas *a* e *b* é, basicamente, a mesma. Compõe-se da porção porfirina, constituída de quatro anéis de pirrol ligados por pontes de carbono-hidrogênio. O íon metálico Mg está inserido no centro da porfirina. O ácido α – aminolevulínico, um aminoácido não-proteico, cuja via de biossíntese tem como precursor inicial o glutamato, é a molécula precursora da clorofila (Kannangara, 1991). Portanto, a disponibilidade de N orgânico na forma de glutamato, pode influenciar a formação de pigmentos cloroplastídicos e, conseqüentemente, a capacidade fotossintética das plantas de milho. Isso pode, pelo menos em parte, explicar os resultados obtidos no presente experimento.

Com relação ao teor de carotenóides nas folhas (Tabela 10), entre as quatro fontes de nitrogênio, na luz, a melhor foi o amônio, quando analisadas de forma isolada, seguida do nitrato associado a amônio. Essa última sobressaiu-se ainda sobre o controle e o nitrato. Quando analisadas no escuro, não apresentaram diferenças entre si, mas todas superaram o controle. Comparando-se as condições de luz, verificou-se que ocorreu diferença apenas quando a fonte de N foi o amônio isolado.

Fato que confirma a regra, plantas bem supridas em nitrogênio (N) apresentam teores de pigmentos fotossintéticos superiores aos de plantas deficientes em N (Majerowicz et al., 2002). Sob condições de crescimento natural, existe uma relação constante e estável entre a máxima taxa fotossintética

e o conteúdo de nitrogênio nas folhas. Isto pode estar associado ao fato de que o nitrogênio nas folhas é utilizado para a formação de pigmentos do cloroplasto que por sua vez é indispensável à fotossíntese.

TABELA 11 - Teor de Carotenóides ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade

Regime de luz	Fontes de nitrogênio			
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$
Claro	0,62Ca*	0,77Ca	1,73Aa	1,27Ba
Escuro	0,54Ba	0,97Aa	1,30Ab	1,13Aa

*Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas, na linha, e minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O teor de clorofila nas folhas de trigo crescido em diferentes condições ambientais representa um parâmetro apropriado para estimar a aquisição de nitrogênio pelas plantas (Shadchina & Dmitrieva, 1995). Corroborando com os resultados aqui apresentados, Fernandes & Rossiello (1995), concluíram que a absorção do amônio ocorre por via de sistema uniporte, por processo passivo e em algumas gramíneas, o suprimento de nitrato e amônio, em quantidades equivalentes, resultou primeiramente na absorção do amônio, sendo a absorção do nitrato significativa apenas quando as concentrações do amônio eram muito baixas.

Condições de crescimento e fatores ambientais podem modificar a razão clorofila *a/b* nas folhas, podendo, por exemplo, variar de acordo com a densidade de luz a que são expostas (Majerowicz, 1997). Nas plantas submetidas a elevadas densidades de fluxo luminoso (DFL), a razão de clorofila *a/b* é de 3,2 - 4,0, ao passo que em baixa DFL esta razão está na faixa de 2,5 - 2,8 (Lichtenthaler, 1987). Nas folhas de milho utilizadas no presente trabalho, a

razão clorofila *a/b* oscilou em torno de 1,7-2,7, valores característicos, portanto, de condições nas quais prevalece baixa DFL.

3.2.2. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e luz sobre o teor de proteínas solúveis

Nas folhas na presença de luz não ocorreu diferenças significativas no teor de proteínas solúveis entre as fontes de nitrogênio (N), porém em relação ao controle, o tratamento com amônio isolado proporcionou o maior teor de proteínas, seguido pela combinação nitrato + amônio, e, por fim, nitrato apenas; este último, porém, não diferiu do controle (Figura 1). Na ausência de luz, em geral, o comportamento verificado foi semelhante àquele anterior, ou seja, as três fontes de N utilizadas foram igualmente eficientes em promover a produção de proteínas solúveis foliares, sendo significativamente superiores ao controle e semelhantes entre si (Figura 1). Condições de baixa disponibilidade de nitrogênio (4,5 mM) acarreta decréscimo nos teores de proteínas solúveis quando comparado a uma situação de alta disponibilidade de nitrogênio (19,9 mM) (Lawlor *et al.*, 1988). No entanto, na presença ou ausência de luz, a fonte de nitrogênio pode apresentar respostas diferenciadas, ocorrendo, provavelmente em função de maior ou menor disponibilidade de esqueletos carbônicos como aceptores de N reduzido necessário para a assimilação do amônio e incorporação em aminoácidos e finalmente, em proteínas. Na ausência de luz, o amônio não difere do controle, o que ocorre quando as plantas foram submetidas a 48 horas de luz contínua (Figura 1).

Não houve diferença entre os tratamentos claro e escuro em relação ao teor de proteínas nas folhas, apesar de haver uma leve tendência a um maior teor protéico nas folhas sob luz contínua (Figura 1).

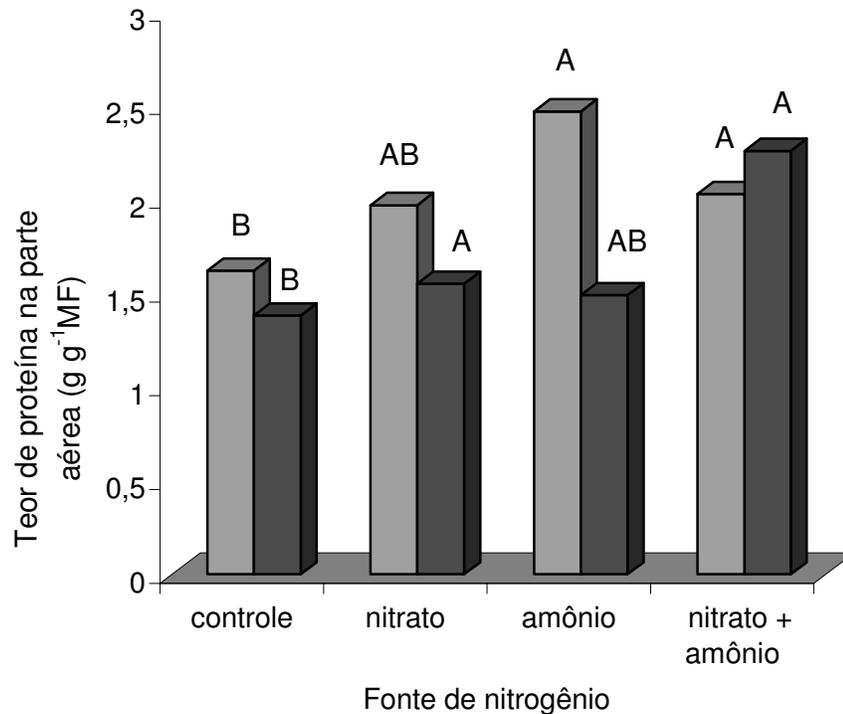


FIGURA 1 - Teor de proteína em folhas de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 a duas condições de luminosidade. Médias seguidas de mesmas letras, entre as fontes, não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Nas raízes, observou-se maior teor de proteínas nas plantas sob iluminação contínua, independente da fonte de nitrogênio utilizada. A fonte nitrogenada mais eficiente foi a associação de nitrato e amônio, que proporcionou um incremento de 137% em relação ao controle. No escuro, a mesma associação também proporcionou o maior teor de proteínas solúveis nas raízes, porém o incremento foi bem menor em relação ao tratamento com nitrato de amônio no claro (Figura 2).

Os tratamentos com nitrato e amônio isolados na ausência de luz por 48 horas não diferiram do controle, porém, quando aplicados em associação, acarretaram um aumento de 58% em relação ao controle (Figura 2).

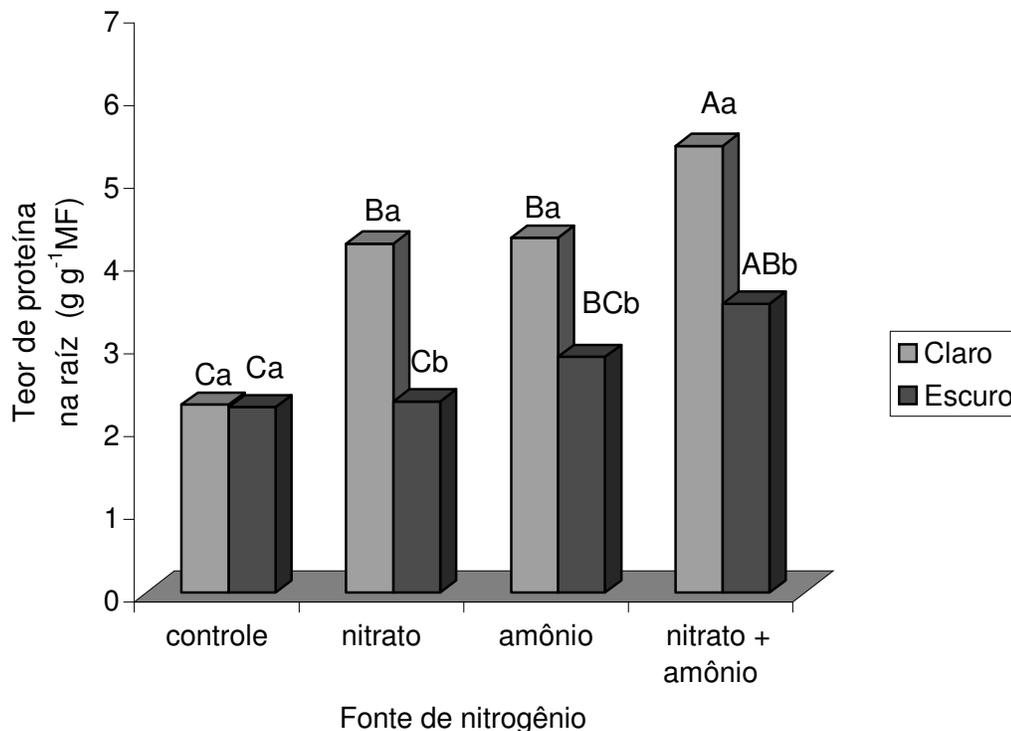


FIGURA 2 - Teor de proteína nas raízes de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas e duas condições de luminosidade. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si, nos tratamentos; e médias seguidas de letras minúsculas distintas, diferem entre si, nos regimes de luz, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Os efeitos de diferentes fontes de N ($N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$) nas concentrações de 5, 20 e 150 ppm em plantas jovens de arroz (14 dias de idade) não há diferenças no que tange aos teores de proteínas solúveis (Fernandes, 1990).

Nas raízes, o teor de proteínas solúveis foi, em geral, maior (Figura 2) que nas folhas (Figura 1). Provavelmente isso possa ter ocorrido pela maior disponibilidade de N nas raízes, local primário de absorção do N fornecido. As plantas tratadas exclusivamente com nitrato ou amônio não diferiram entre si, sob iluminação, mas o teor de proteínas nas plantas que receberam as duas formas associadas, diferiu das fontes isoladas e do controle, sendo significativamente maior (Figura 2). Esses resultados são similares aos resultados encontrados por Lemos *et al.* (1999) em plantas de seringueira, com aumentos significativos nos teores de proteína em folhas e raízes quando estas receberam N, sendo

esse aumento independente da proporção de NO_3^- e NH_4^+ na solução nutritiva. Porém, nas raízes não há diferenças entre as plantas tratadas exclusivamente com NO_3^- ou NH_4^+ , mas aquelas tratadas com 2 mM NO_3^- e 6 mM NH_4^+ têm maiores teores de proteínas que plantas cultivadas exclusivamente com NO_3^- .

3.2.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e luz sobre o teor de carboidratos solúveis totais

Nas folhas não houve diferença entre os tratamentos quando as plantas foram mantidas no claro e que, no escuro, a presença de nitrogênio na solução, não contribuiu para elevar o teor de carboidratos solúveis totais (Figura 3).

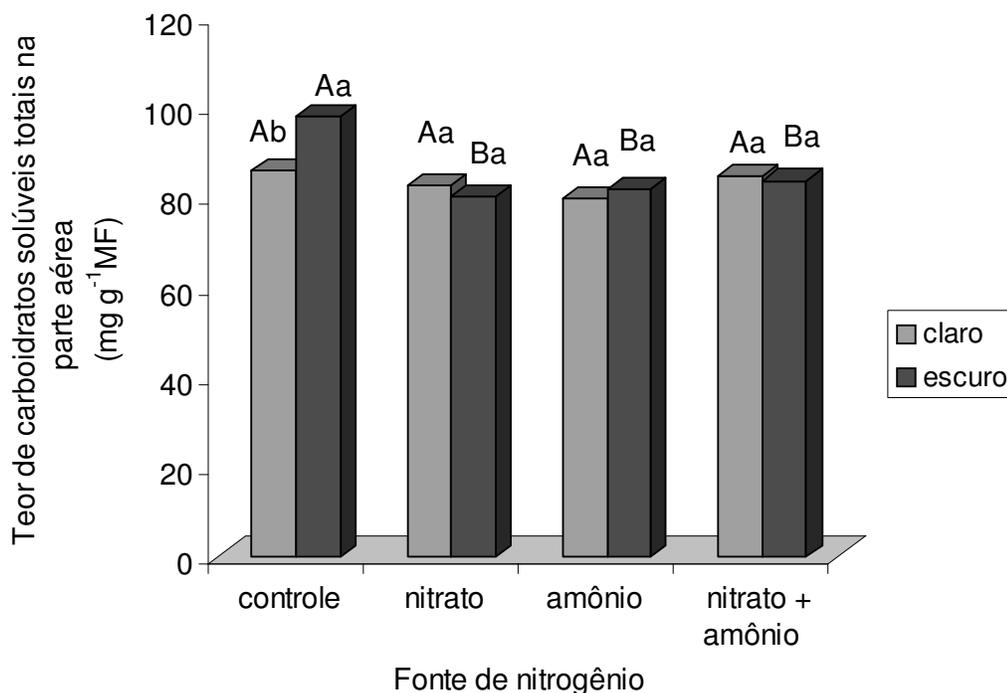


FIGURA 3 - Teor de carboidratos solúveis totais nas folhas de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas e duas condições de luminosidade. Médias com letras maiúsculas distintas, diferem entre si, nos tratamentos e médias com letras minúsculas distintas, as médias diferem entre si, nos diferentes regimes de luz, ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

No claro, independente da fonte nitrogenada usada, o teor de açúcares solúveis totais nas raízes foi superior aos das plantas submetidas a condições de ausência de luz por 48 horas. Não ocorreram, entretanto, diferenças significativas entre os tratamentos, quer seja no claro ou no escuro.

O maior teor de carboidratos totais das raízes foi de 51 mg g⁻¹ MF em nitrato + luz e o menor foi de 43 mg g⁻¹ MF, em amônio + escuro (Figura 4), uma diferença, portanto, de 16% entre os dois tratamentos.

Apesar da maioria das espécies vegetais não ser capaz de se desenvolver adequadamente tendo amônio como única fonte de N, já foi observado inúmeras vezes que o crescimento vegetal pode ser beneficiado quando as plantas são fertilizadas com uma fonte contendo nitrato e amônio (Lemos *et al.*, 1999).

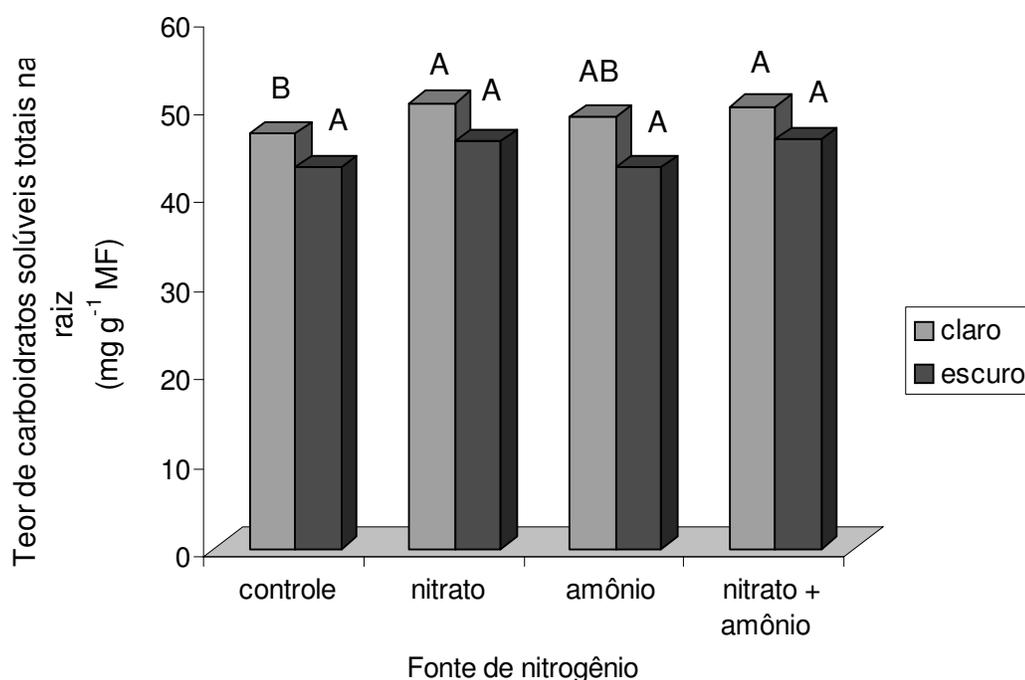


FIGURA 4 - Teor de carboidratos solúveis totais nas raízes de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade. Médias com letras maiúsculas distintas diferem entre si nas diferentes fontes de nitrogênio ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

3.2.4. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio e luz sobre a atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de milho

Nas folhas das plantas mantidas em condições de luminosidade, a atividade da redutase do nitrato (ARN) teve eficiência semelhante nas três fontes de nitrogênio usadas (Figura 5). Mesmo não ocorrendo diferenças entre claro e escuro, houve uma tendência a maior atividade no claro. Ao que parece a luz não teve um efeito acentuado sobre a regulação da atividade da enzima. Sabe-se que a RN é regulada por vários mecanismos que envolvem fatores endógenos e exógenos. Provavelmente, nas plantas de milho no estágio avaliado no presente experimento, a luz não é o principal fator a controlar a atividade da redutase do nitrato.

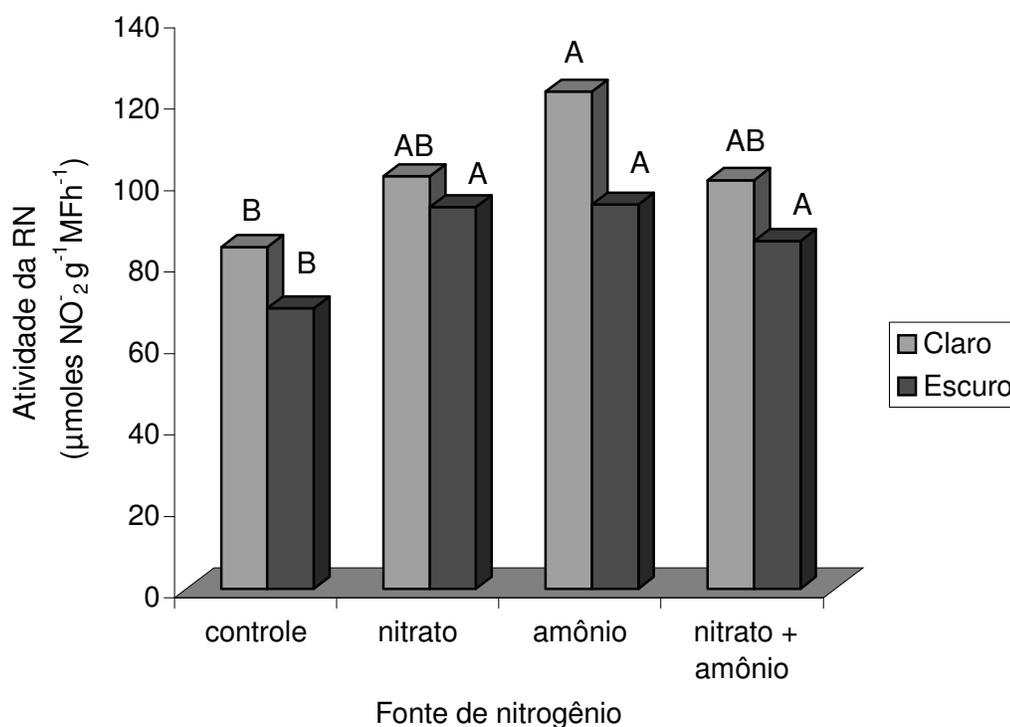


FIGURA 5 - Atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas de plantas de milho cultivado com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade. Médias seguidas de mesmas letras, entre fontes, não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

No escuro, as fontes não diferiram estatisticamente entre si, porém, como era de se esperar, apresentaram valores mais baixos daqueles observados em condições de luz e todas as fontes superaram o controle.

A glicose ou a sacarose podem substituir a luz na indução do acúmulo de RNAm da RN, sugerindo que os esqueletos carbônicos seriam os fatores determinantes na atividade dessa enzima (Lillo, 1994). De forma semelhante, Sivasankar (1997) mostrou que na presença de sacarose a atividade da redutase do nitrito (Rni) é aumentada. Testes desse tipo demonstram que a luz por si só parece não ser um requerimento absoluto para a redução do nitrato, uma vez que níveis consideráveis de atividade enzimática podem ocorrer nos tecidos, com um suprimento adequado de carboidratos (Guerrero *et al.*, 1981).

O nitrato pode induzir a ARN por um aumento da “síntese de novo” da proteína ou por ativação da proteína redutase do nitrato (PRN) pré-existente (Srivastava, 1980; Oaks *et al.*, 1982; La Haba *et al.*, 1988; Sttit & Krapp, 1999). Remmler & Campbell (1986) registraram um aumento na PRN em folhas de milho quando o nitrato é adicionado ao meio nutritivo, seguido de um incremento da atividade RN. Também, incremento na transcrição do gene *Nia*, que expressa a PRN, na presença de nitrato e luz (Sttit & Krapp, 1999). O amônio, por sua vez, pode apresentar tanto efeito inibidor como efeito estimulador dessa enzima (Srivastava, 1980).

Nas raízes a enzima foi menos eficiente em relação às folhas na redução do nitrogênio. Ainda quando nitrato e amônio foram usados de forma associada houve um decréscimo de 20% em relação ao nitrato isolado (Figura 6).

Datta *et al.*, (1981), observaram que o amônio estabiliza a atividade da RN em folhas de trigo, por meio de algum mecanismo *in vivo* ainda não identificado. Segundo Oaks (1982) a adição de nitrato e amônio quando comparados com adição única de nitrato, geralmente aumentam os níveis de RN em raízes e folhas de plântulas.

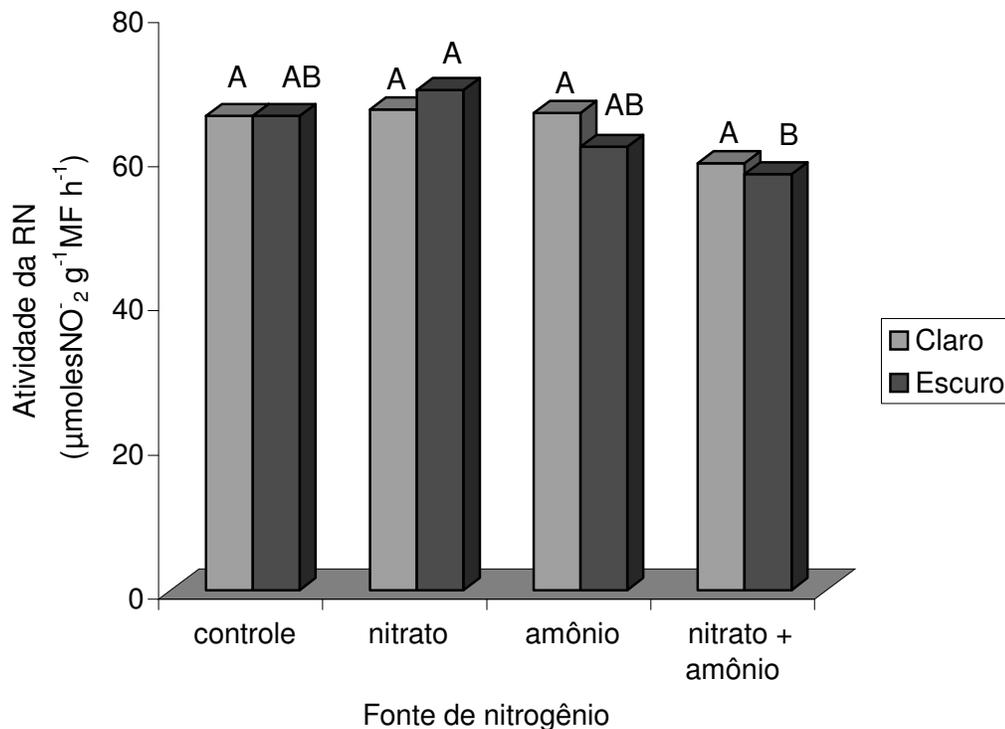


FIGURA 6 - Atividade da enzima redutase do nitrato nas raízes de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a duas condições de luminosidade. Médias seguidas de mesmas letras, entre fontes, não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Skoczek (1992) determinou que NH_4NO_3 estimula a atividade da NR de folhas de cevada. Oaks **et al.** (1982) determinaram em folha de milho, que o nitrato é responsável pela indução do precursor da PRN e em altas concentrações pela ativação desse precursor. A adição de amônio ao sistema, também, permite a indução do precursor da PRN e o aumento da atividade da RN. Em milho, NH_4NO_3 é tão ou mais efetivo que KNO_3 no estímulo da síntese da PRN (Remmler & Campbell, 1986). Além disso, a RN de plantas cultivadas em NH_4NO_3 é mais resistente a extração e purificação do que aquelas que foram cultivadas somente com NO_3^- (Datta **et al.**, 1981).

Testes feitos em abacaxizeiro (*Ananas comosus*) mostram que para as folhas, o período de maior atividade da RN ocorre durante a presença de luz (Nievola & Mercier, 2001). Já as raízes do abacaxizeiro apresentaram atividade da enzima tanto

na presença como na ausência da luz. Devido as maiores concentrações de nitrato se manifestarem na ausência da luz no sistema radicular, sugere-se que outros fatores além do nitrato estão contribuindo positivamente, induzindo uma elevada atividade enzimática na presença da luz. Tanto para as raízes como folhas, as maiores atividades da RN foram observadas na faixa de pH entre 6,5 e 7,5, a temperatura entre 30 e 35°C e a concentração mais adequada de nitrato foi a de 100 mM. O aumento da atividade da enzima em resposta ao incremento do substrato tem sido associado a “síntese de novo” da proteína, bem como a sua ativação (Solomonson & Barber, 1990).

Em espécies arbóreas a quantidade de nitrato aplicado pode variar entre 25 mM e 100 mM (Cairo **et al.**, 1994), evidenciando alta atividade da RN. Em relação a temperatura, Singh (1994) demonstrou que a 40°C, essas espécies mantinham alta atividade dessa enzima, verificando-se assim que as condições de ensaio *in vivo* requisito importante à determinação da atividade da RN.

A eficiência na assimilação do nitrogênio varia com o genótipo e, dentre outros fatores, como a estação do ano. A atividade da redutase do nitrato (ANR) *in vivo* e sua relação com o acúmulo de nitrogênio em plantas jovens de milho de seis diferentes cultivares, conduzem a: (1) baixa atividade da NR por unidade de área foliar, por unidade de tempo, com alto acúmulo de N, (2) alta ANR com baixo conteúdo de N e (3) baixa ANR com baixo conteúdo de N (Kumar e Singh, 2002).

Neste trabalho houve relação entre ANR (Figura 5) e acúmulo de N- protéico (Figura 1) nas folhas e durante o período luminoso. Entretanto não houve relação nas raízes, o que demonstra que além do genótipo e estação, os diferentes órgãos vegetativos podem apresentar respostas diversas na atividade da redutase do nitrato e sua correlação com o acúmulo de nitrogênio.

Tendo em vista que a produtividade das plantas cultivadas é garantida pela utilização de quantidade cada vez maior de fertilizantes nitrogenados, isto tem elevado os custos e ocasionado contaminação ambiental (Majerowicz **et al.**, 2002). Para a cultura do milho, estima-se que os fertilizantes nitrogenados correspondam a 40% do custo total de produção (Machado, 1997). Assim é importante a descoberta de caminhos possíveis para aumentar a eficiência no uso do nitrogênio (EUN).

Um dos mais simples é a diminuição nas doses de adubos para níveis que sejam produtivos (Fernandez *et al.*, 1998). Outra possibilidade é o melhoramento genético, que já tem gerado milhos produtivos para solos pobres em nitrogênio (Machado, 1997; Santos *et al.*, 1998). Correlações elevadas entre a produção e alguns caracteres fisiológicos como a concentração de clorofila e altura das plantas são obtidas (Lafitte & Edmeades, 1994). O papel das enzimas de assimilação do nitrogênio como característica indicativa da EUN é usado por alguns autores.

No presente trabalho, as fontes de N influenciaram de forma similar a atividade da redutase do nitrato e o acúmulo de massa seca e proteínas, tanto nas folhas (Tabela 12) quanto nas raízes (Tabela 13). As maiores atividades da enzima, sempre coincidiram com os maiores acúmulos de massa seca e proteínas nas folhas. Os maiores valores foram observados na presença de nitrogênio, independente da fonte e regime de luz.

TABELA 12 - Atividade da redutase do nitrato, massa seca e teor de proteínas solúveis em folhas de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a dois regimes de luz

		Características		
		Redutase do nitrato ($\mu\text{moles NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MFh}^{-1}$)	Massa Seca (g)	Proteínas ($\text{gg}^{-1} \text{ MF}$)
Claro	controle	86b	0,23b	1,7b
	NO_3^-	105ab	0,45a	2,0ab
	NH_4^+	125a	0,32a	2,5a
	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	103ab	0,39a	2,1a
Escuro	controle	70b	0,20b	1,4b
	NO_3^-	99a	0,37a	1,6a
	NH_4^+	98a	0,43a	1,5ab
	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	88a	0,42a	2,3a

TABELA 13 - Atividade da redutase do nitrato, massa seca e teor de proteínas solúveis em raízes de plantas de milho cultivadas com diferentes fontes de nitrogênio e submetidas por 48 horas a dois regimes de luz

		Características		
		Redutase do nitrato	Massa Seca	Proteínas
		($\mu\text{moles NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MFh}^{-1}$)	(g)	($\text{gg}^{-1} \text{ MF}$)
Claro	controle	68a	0,44a	2,4c
	NO_3^-	69a	0,54a	4,4b
	NH_4^+	69a	0,55a	4,4b
	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	62a	0,42a	5,6a
Escuro	controle	61ab	0,36b	2,4c
	NO_3^-	74a	0,47ab	2,4c
	NH_4^+	63ab	0,56a	3,0bc
	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	61ab	0,32b	3,6ab

Há correlação positiva entre o teor de NO_3^- , a atividade da glutamina sintetase e a produtividade do milho (Gallais e Hirel, 2004), mas não houve correlação entre atividade da redutase do nitrato e a produtividade. O aumento da produtividade em genótipos de milho foi consequência da maior capacidade de acúmulo de NO_3^- durante a fase vegetativa de desenvolvimento e a eficiente remobilização do nitrogênio armazenado durante o enchimento dos grãos (Hirel *et al.*, 2001). Entretanto no presente trabalho as avaliações foram feitas apenas durante o estágio de plântula.

4. CONCLUSÕES

Nas condições utilizadas no presente experimento, conclui-se que:

A concentração de 5 mM de quaisquer uma das fontes de nitrogênio testadas é suficiente para aumentar o crescimento das plantas analisadas;

A luz não influencia e a adição de 5 mM de nitrogênio proporciona incremento no teor de pigmentos fotossintéticos;

O teor de proteínas solúveis nas folhas responde de forma positiva a adição de fontes exógenas de nitrogênio;

Verifica-se efeitos positivos de incremento nos teores de carboidratos solúveis totais e proteínas solúveis nas de plantas mantidas sob iluminação;

A atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas é maior do que a observada nas raízes;

A luz não teve influência sobre a atividade da redutase do nitrato;

Há relação positiva, no claro, entre o acúmulo de massa seca e a atividade da enzima redutase do nitrato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNON, D.J. Cooper enzymes in solated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, 24: 1-15, 1945.
- ARNON, I. **Mineral Nutrition of maize**. Bern, Internationale Potash Institute, 1975, 452p.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.
- CAIRO, P.A.R., OLIVEIRA, L.E.M. & DELÚ FILHO, N. Determinação das condições ótimas para o ensaio in vitro da redutase do nitrato em algumas espécies arbóreas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 18: 87-95, 1994.
- CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase biochemistry comes of page. **Plant Physiology**, 111: 355-361, 1996.
- CARELLI, C.M.L.; UNGARO, G.M.R.; FAHL, I.J.; NOVO, S.S..M.C. Níveis de nitrogênio, metabolismo, crescimento e produção de girassol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 8: 123-130, 1996.
- CLEGG, K.M. The application of the anthrone reagent to the estimation fo starch in cereals. **Journal of Science Food Agricultural**, .3: 40-44, 1956.
- COSTA, C.; DWYER, L. M.; STEWART, D. W.; SMEET, D. L.; Nitrogen effect on grain yield and yield components of leafy and nonleafy maize genotypes. **Crop Science**, 42: 1556-1563, 2002.

- CRAFTS-BRANDNER, S.J & HARPER,J.E.. Nitrate Reduction by roots of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) seedlings. **Plant Physiology**, 69: 1928-1303, 1982.
- CRAWFORD, T.W.; RENDIG, V.V.; BROADBENT, F.E.; Sources, fluxes, and sinks of nitrogen during early reproductive growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, 70: 1654-1660, 1982.
- DATTA, N.; RAO, L. V. M; GUHA-MUKHERJEE, S.; SOPORY, S. K. Regulation of nitrate reductase activity by ammonium in wheat. **Plant Science Letters**, 20: 305-313, 1981.
- FERNANDES, M.S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sob a absorção e assimilação de N em arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 2: 1-6, 1990.
- FERNANDES, M.S.; ROSSIELO, R.O.P.; Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. In: Critical Reviews in **Plant Sciences**, 14: 111-118, 1995.
- FERNANDEZ, J. E.; MURILLO, J. M.; MORENO, F.; CABRERA, F.; FERNANDEZ – BOY, E. Reducing fertilization for maize in southwest Spain. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, 29: 2829-2840, 1998.
- FONTES, P.R.; BARBER, S.A Crescimento do sistema radicular e cinética de absorção de fósforo pelo tomateiro, afetados por concentrações de fósforo na solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 19: 1203 – 1210, 1984.
- GALLAIS, A.; HIREL, B. Na approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, 55: 295-306, 2004.
- GUERRERO, M. G.;VEGA, J.M.:LOSADA, M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Ann. Rev. **Plant Physiology**, 32: 169-204, 1981.
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BORDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, 125: 1258-1270, 2001.
- HOFF.T.,STUMMAN,M., & HENNINGSEN, K.W.,. Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, 84: 614-124, 1992.

- KAISER, W. M.; KANDBINDER, A.; STOIMENOVA, M.; GLAAB, J. Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: what limits nitrate reduction in situ. **Planta**, 210: 801-807, 2000.
- KANNANGARA, C.G.; Biochemistry and molecular biology of chlorophyll synthesis. In: BOGORAD, L.; VASIL, I.K.; (ED.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, 7: 301-322, 129-136, 2002.
- KARLEN, D.L.; FLANERY, R.L.; SADLER, E.J.; Aerial accumulation and partitioning of nutrients by corn. **Agronomy Journal**, 80: p. 232-242, 1988.
- KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. Advances in nitrate assimilation. In the Biochemistry of plants (B.J. Mifflin & P.J. Stewart. Eds.) **Academic Press Inc.**, 16: 89-120, 1990.
- KUMAR, S.N.; SINGH, C.P. An analysis of seasonal effects on leaf nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, 188: 133-137, 2002.
- LA HABA, P.; AGUERA, E.; MALDONADO, J. M. development of nitrogen assimilation enzymes in sunflower cotyledons during germination as affected by the exogenous nitrogen source. **Plant**, 173: 52-57, 1988.
- LAFITTE, H. R.; EDMUNDS, G. O. Improvement for tolerance to low soil nitrogen in tropical maize. II grain yield, biomass production, and nitrogen accumulation. **Field Crop Research**, 39: 15-25, 1994.
- LAWLOR, D. W.; BOYLE, F. A.; KEYS, A. J.; KENDALL, A. C.; YOUNG, A. T. Nitrate nutrition and temperature effects on wheat: a synthesis of plant growth and nitrogen uptake in relation to metabolic and physiological processes. **Journal of Experimental Botany**, 39: 329-343, 1988.
- LAWLOR, D. W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production system. **Journal of Experimental Botany**, 53: 773-787, 2002.
- LEMOS, G.B.; DELÚ, N.F.; OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C. Atividade das Enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11: 113-118, 1999.
- LI, X.; OAKS, A. Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*: influence of NO_3^- . **Plant Physiology**, 102: 1251-1257, 1993.

- LICHTENTHALER, H.K. **Chlorophylls and carotenoids:** Pigments of photosynthetic biomembranes. San diego: Academic press, Methods in Enzymology, 148: 380-382, 1987.
- LILLO, C. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. **Plant Physiology**, 90: 616-620, 1994.
- MACHADO, A. T. **Perspectiva do melhoramento genético em milho (*Zea mays* L.) visando eficiência na utilização do nitrogênio.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.
- MACHADO, A. T.; SODEK, L.; PATERNIANI, E. Atividade das enzimas reductase do nitrato e glutamina sintetase em populações de milho Sol da Manhã NF e Catetão. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13: 88-102, 2001.
- MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, M.S.J.;MEDICI, O.L.; BISON, L.;PEREIRA, M.B.; JUNIOR, S.M.U. Estudo da eficiência do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira de Botânica**, 25: 129-136, 2002.
- MAJEROWICZ, N. **Crescimento, assimilação e teores de compostos nitrogenados em plantas de *Catasetum fibriatum* (Morren) Lindl. (Orchidaceae) cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio.** Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 133p., 1997.
- MARCHNER,H. **Mineral Nutrition of higher Plants**, 2 ed., Academic Press, 889p., 1995.
- McCREDADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA,V.; OWENS, H.S., Determination of starch and amylase in vegetables. **Anal Chem.**, 22: 1156-1158, 1950.
- MENGEL K.; KIRKBY, E. A. Principles of Plant nutrition. International Potash Institute, Worblaufen-Bern, Switzerland, 1987.
- NABINGER, C. Eficiência do uso de pastagens: disponibilidade de perdas e forragem.in: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM. **Anais**. Piracicaba: FEALQ: 213-251, 1997.
- NELSON, T.; DENGLER, N. Leaf vascular pattern formation. **The Plant Cell**, 9: 1121-1125, 1997.
- NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H. Variações diurnas da atividade *in vivo* da reductase do nitrato em abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Botânica**, 24: 295-301. 2001.

- OAKS, A. A Re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. **BioScience**, 42: 103-11, 1982.
- OAKS, A.; POULLE, M.; GOODFELLOW, V.J.; CASS, L.A.; DEISING, H. The role of nitrate and ammonium ions and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. **Plant Physiology**, 88: 1067-1072, 1982.
- PURCINO, A. A.C.; PAIVA, E.; SILVA, M.R. & ANDRADE, S.R.M. Influence of Azospirillum inoculation and nitrogen supply on grain yield, and carbon, and nitrogen assimilation enzymes in maize. **Journal of Plant Nutrition**, 19: p. 1045-1060, 1996.
- PURCINO, A. A.C, ARELLANO, C.; ATHWAL, G.S. & HUBER, S.H. Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding, 43: 83-94, 1998.
- QUEIROZ, C.G.S., RENA, A.B., CORDEIRO, A.T., ALVES, J.D., Ritmo Diurno na atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de COFFEA ARABICA L. **Pesq. Agrop. Bras.**, 28: 787 – 795, 1993.
- REMMLER, J. L.; CAMPBELL, W. H. Regulation of corn leaf nitrate reductase. Synthesis and turnover of the enzymes activity and protein. **Plant Physiology**, 80: 442-447, 1986.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C.W. **Fisiologia Vegetal**. Grupo Editorial Iberoamerica S/A. , 760p., 1992.
- SANTOS, M. X.; GUIMARÃES, P. E. O.; PACHECO, C. A. P.; FRANÇA, G. E.; PARENTONI, S. N.; GOMES-E-GAMA, E. E.; LOPES, M. A. Melhoramento intra-populacional no sintético Elite NT para solos pobres em nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33: 55-61, 1998.
- SCOCZEK, H. Nitrate reductase activity and protein content in leaves and roots of two doubled haploid barley lines depending on seedlings age and nitrogen source. **Acta Physiologia Plantarum**, 14: 77-84, 1992.
- SHADCHINA, T. M. & DMITRIEVA, V. V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from soil. **Journal of Plant Nutrition**, 18: 1427-1437, 1995.
- SHIGAKI, F.; ARAÚJO, S.E.; ZONTA, E.; LIMA, E. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular da cultivar de arroz Comum Branco sob diferentes níveis de nitrogênio. In: **VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, 5, Anais. Ilhéus, BA, Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2001.

- SINGH, V.K. Optimum conditions for measurement of nitrate reductase activity in the leaves of blast fibre yielding plants. *Proceedings Natural Academic Science India*, 64: 389-398, 1994.
- SIVASANKAR, S.; OAKS, A. Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiology*, 34: 609-620, 1996.
- SIVASANKAR, S., ROTHSTEIN, S., OAKS, A. Regulation of the Accumulation and Reduction of Nitrate by Nitrogen and Carbon metabolites in Maize Seedlings. *Plant Physiology*, 114: 583-589, 1997.
- SRIVASTAVA, H. S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry*, 19: 725-733, 1980.
- STTIT, M.; KRAPP, A. The interation between elevated carbon dioxide nd nitrogen nutrition: the physiology and molecular background. *Plant Cell and Environment*, 22: 583-621, 1999.
- SOLOMONSON, L. P. & BARBER, M. J. Assimilatory nitrate reductase: functinal properties and regulation. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 41: 225- 253, 1990.
- TAIZ, L. & ZEIGER. E. *Plant Physiology*. Second edition, Ed. Sinauer Associates, Sunderland, 792p., 1998.
- TEIXEIRA, D.V., Milho - Superando limites de produtividade. *Divulgação Técnica Manah*, 16, 2004.