

## Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*)<sup>1</sup>

### Nitrate reductase activity in peach palm (*Bactris gasipaes*) seedlings

Maria Aparecida José de Oliveira<sup>2</sup> Marilene Leão Alves Bovi<sup>3</sup>  
Eduardo Caruso Machado<sup>4</sup> João Domingos Rodrigues<sup>5</sup>

#### RESUMO

A enzima redutase de nitrato (EC 1.6.6.1) é a principal enzima responsável pela assimilação de nitrogênio pelas plantas e tem a atividade fortemente afetada pela disponibilidade de água no solo, por isso é usada como variável na avaliação das plantas em diferentes condições ambientais. Assim, este estudo teve como objetivo a padronização de metodologia para avaliação *in vivo* da atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de pupunheira com nove meses e um ano. As mudas foram cultivadas em casa de vegetação e os ensaios realizados de acordo com método clássico de análise *in vivo*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições. A atividade máxima da enzima em folhas foi obtida com tempo de incubação ao redor de 60 minutos, pH do meio de reação em torno de 7, temperatura de 35 a 37°C e concentração de nitrato entre 28 a 30mmolL<sup>-1</sup>. A atividade desta enzima foi maior em plantas com nove meses de idade. As folhas mostraram maior atividade da enzima quando comparadas com as raízes. A atividade da enzima redutase de nitrato variou ao longo do dia, com máxima obtida às 10 horas, mostrando a influência do período luminoso e do estado hídrico da planta.

**Palavras-chave:** *Bactris gasipaes*, enzima redutase de nitrato, luz, temperatura, concentração de nitrato.

#### ABSTRACT

The nitrate reductase enzyme (EC 1.6.6.1) is the main responsible enzyme for the assimilation of nitrogen by plants and its activity is strongly affected by the soil water availability. This feature allows the use of this enzyme to evaluate plants in different environmental conditions. The objective of this study was to standardize the methodology to evaluate *in vivo* the nitrate reductase activity in leaves and roots of nine months and one year old peach palms (*Bactris gasipaes*). The plants were cultivated in a nursery and the essays were conducted according to the classical method of *in vivo* analyses. The experimental design was entirely randomized with six repetitions. The results showed that maximum nitrate reductase activity for leaves was obtained with an incubation time of 60 minutes, pH 7, temperatures from 35 to 37°C and, nitrate concentrations between 28 and 30mmol L<sup>-1</sup>. The nitrate reductase enzyme activity was higher in nine months than in one year old palms. The peach palm leaves showed higher enzyme activity than roots. The nitrate reductase activity varied during the day, with maximum activity at 10 hours, indicating an influence by light and leaf water potential.

**Key words:** *Bactris gasipaes*, nitrate reductase enzyme, light, temperature, nitrate concentration.

<sup>1</sup>Trabalho realizado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

<sup>2</sup>Biólogo, Doutor, Universidade Federal da Bahia, (UFBA), Rua Senta Pua, 287, apartamento 102, 40170-180, Salvador, Bahia, BA, Brasil. E-mail: cidinha100@uol.com.br.

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, PhD., Pesquisadora Científica do Centro de Horticultura, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), CP 28, Avenida Barão de Itapura, 1481, 13001-970, Campinas, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador Científico do Centro de Ecofisiologia e Biofísica, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), CP 28, Rua Barão de Itapura, 102, 13001-970, Campinas, SP, Brasil. Bolsista de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

<sup>5</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Titular do Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista de Botucatu, SP, UNESP/IBB, Rod. Rubião Junior s/ n, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil.

## INTRODUÇÃO

A palmeira *Bactris gasipaes* é originária da América tropical, sendo também conhecida como palma doce, pejobaye no Peru e pupunha no Brasil. Devido à sua introdução na região Sudeste do Brasil (BOVI, 1993), muitos estudos têm sido realizados, mas ainda existem lacunas em relação à sua adaptação fisiológica. A estimativa da atividade da enzima redutase de nitrato tem sido utilizada, com sucesso, como parâmetro indicativo da resposta fisiológica de plantas submetidas a condições adversas (MEGURO & MAGALHÃES, 1982). O nitrato é a principal forma de nitrogênio inorgânico disponível para as plantas e a redutase de nitrato é a primeira enzima da rota de assimilação do N-inorgânico, assumindo, portanto, papel de extrema importância no metabolismo vegetal (DELÚ-FILHO et al., 1998). A variação na atividade em função da hora do dia foi observada em várias espécies (MEGURO & MAGALHÃES, 1982; OLIVEIRA & PEREIRA-NETTO, 1993; NIEVOLA & MERCIER, 2001). Foi verificada também alteração na atividade conforme a idade da planta (SMIRNOFF & STEWART, 1985; CARELLI et al., 1990). Em algumas espécies, o sítio principal de redução do nitrato está nas raízes (QUEIROZ et al., 1993; OLIVEIRA et al., 1996; DELÚ-FILHO et al., 1998), enquanto que, em outras espécies, a maior atividade da redutase de nitrato foi verificada nas folhas (SMIRNOFF et al., 1984).

O método de avaliação da atividade da enzima redutase *in vivo*, consiste na incubação do tecido vegetal em meio apropriado de ensaio, em condições de escuro, sendo a taxa de difusão do nitrito para a solução de incubação utilizada como indicadora da atividade da enzima. Nesse tipo de análise, acredita-se que haja uma absorção prévia do nitrato pelo tecido, que exista uma concentração endógena de NADH e que ocorra a subsequente liberação do nitrito formado para o meio de reação (LEE & TITUS, 1992). Os objetivos deste estudo foram: a) padronizar o método para avaliar *in vivo* a atividade da enzima redutase de nitrato em folhas; b) analisar a variação diária desta enzima em plantas de 9 e 12 meses de idade; e c) comparar a atividade da redutase em folhas e raízes de plantas dessas duas idades.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Horticultura do Instituto de Agrônomo de Campinas (Campinas-SP). Sementes de pupunheiras de origem peruana (raça Putumayo), foram postas para germinar em vermiculita. Após a

germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 3,0L, contendo solo e esterco bovino na proporção de 3:1 em volume. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com irrigações diárias. Para os diferentes experimentos foram selecionadas plantas homogêneas quanto ao desenvolvimento vegetativo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com a comparação entre as médias feitas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em folhas de plantas com nove meses foram padronizadas as condições de ensaio, avaliando-se o tempo de reação (entre 0 e 120 minutos), o pH do meio de reação (variando entre 5,0 e 8,0), a temperatura de incubação (entre 15 e 45°C) e a concentração de nitrato no meio de reação (com intervalos entre 0 e 150mmol L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>). As coletas dos fragmentos foliares foram efetuadas nas folhas mais novas, conhecidas como folhas flecha. Esta coleta ocorreu em dia de céu aberto (ensolarado), sendo feita aproximadamente às 10 horas. O ensaio *in vivo* da redutase de nitrato foi efetuado pelo método modificado por MEGURO & MAGALHÃES (1982) com alterações realizadas visando otimizar a técnica para folhas de pupunheira. Segmentos de tecidos foliares (100mg) foram incubados em frascos de vidro contendo 5ml de solução tampão fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1mol L<sup>-1</sup>), pH 7,0, adicionado de 1ml de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub> 0,25mol L<sup>-1</sup>) e 1ml de n-propanol (1% v/v), com posterior transferência para banho-maria a 30°C, sob agitação e ausência de luz. Após 60 minutos, foi transferido 1,0ml do meio de reação para tubos de ensaio contendo: 1,0ml de n-naftil etileno diamina 0,01% (m/v), 1,0ml de sulfanilamida 0,1% em HCl 3,0mol L<sup>-1</sup>. O n-propanol é usado para aumentar a permeabilidade celular ao nitrato e nitrito (JAWORSKI, 1971), além de facilitar a transferência do nitrato presente no meio de incubação, ou oriundo do vacúolo, para o citoplasma, onde ficaria mais disponível para ação da enzima da redutase de nitrato (JONES & SHEARD, 1977). A concentração de nitrito produzida foi determinada em espectrofotômetro a 540nm. A atividade da enzima redutase foi expressa em micromol de nitrito produzido por grama de matéria fresca (mf) por hora (μmol de NO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> mf h<sup>-1</sup>).

Experimento adicional, também em delineamento inteiramente casualizado, foi realizado com plantas de 9 e 12 meses, com seis repetições por idade, mantidas em casa de vegetação. A finalidade deste experimento foi verificar a ocorrência de diferenças na atividade da enzima quanto à idade fisiológica das mudas e quanto ao

sítio de ação da enzima. Mediu-se a atividade da enzima e o potencial de água ( $\psi$ ) das folhas em função das horas do dia. Os horários de coletas foram: 7h, 10h, 13h, 15h e 17h. Para as medidas da atividade da enzima redutase de nitrato, foram coletados fragmentos das folhas flechas, e para as medidas do potencial de água da folha ( $\psi$ ), por meio da câmara de pressão (SCHOLANDER et al., 1965) foi coletada a segunda folha mais nova (folha +2), completamente expandida. Dessas mesmas plantas, foram coletadas raízes ativas, com coloração branca e presença de coifa e com diâmetro em torno de 2mm. Os segmentos radiculares foram lavados com água destilada e incubados *in vivo* segundo o mesmo método utilizado na determinação da atividade da enzima nas folhas, descrito anteriormente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A liberação de nitrito pelos tecidos foliares, apresentou relação, praticamente linear em função do tempo de incubação (Figura 1A). Verificou-se que a liberação do nitrito pelos tecidos é acentuada nos primeiros 10 minutos, tornando-se mais lenta entre 10 e 30 minutos, aumentando acentuadamente a partir desse período. Essa resposta está relacionada tanto ao requerimento de tempo para completa infiltração do meio de reação, bem como a necessidade de tempo para homogeneização da temperatura. A taxa de difusão do nitrito formado como resultado da atividade da enzima para o meio de reação é utilizado como indicador dessa atividade (CARELLI et al., 1990). No presente estudo, adotou-se como 60 minutos o tempo adequado de incubação para produção de nitrito pelas células

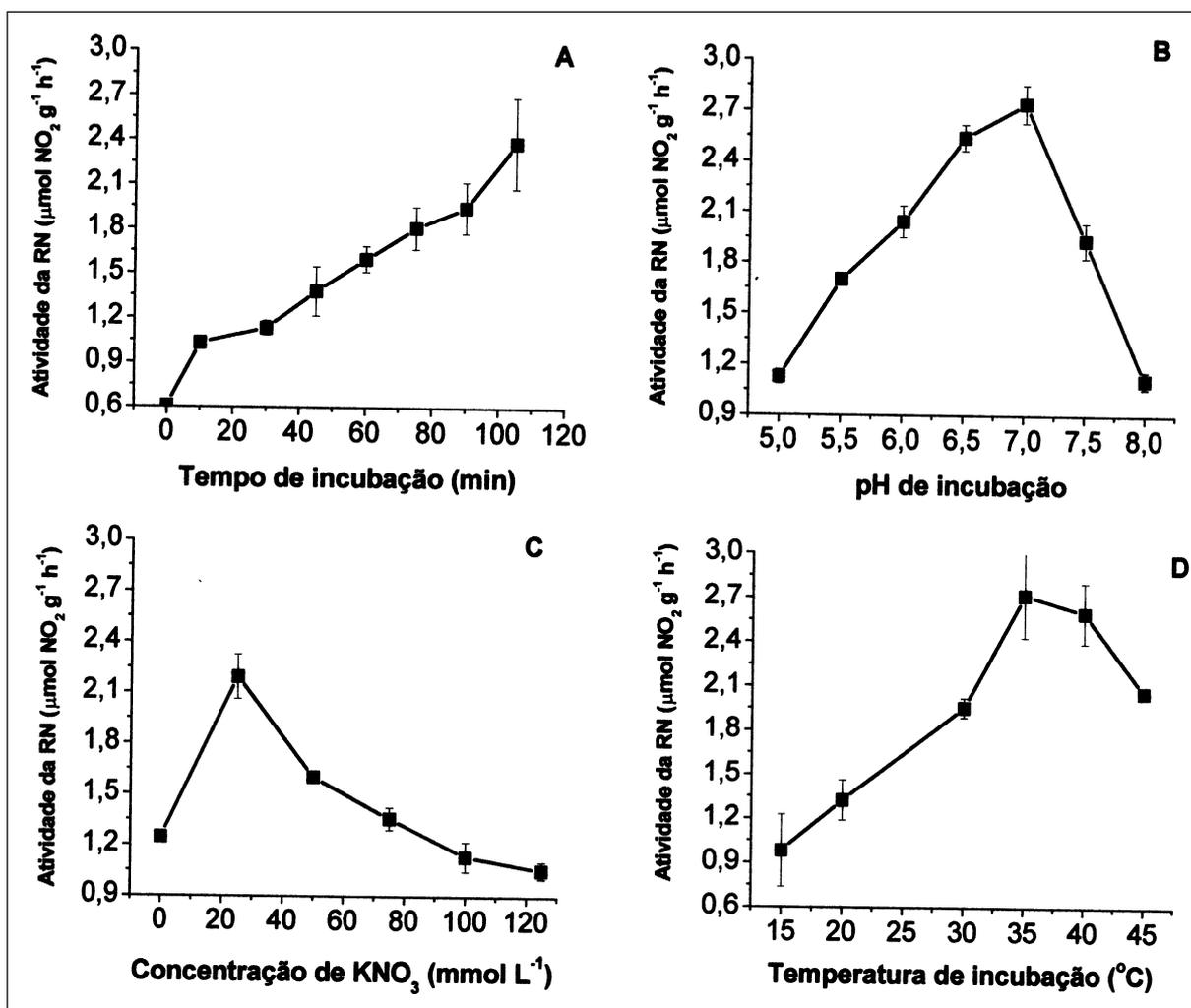


Figura 1- Atividade da enzima redutase de nitrato (RN) em folhas de pupunheira de nove meses de idade em função do tempo de incubação (A), pH (B), concentração de KNO<sub>3</sub> (C) e temperatura do meio da reação (D).

de tecido foliar de pupunheira. DELÚ-FILHO et al. (1998) também verificaram em mudas de seringueira aumento da atividade da enzima até 180 minutos de tempo de reação. No entanto, L'VOV & SAFARALIEV (1988) recomendam que não se deve prolongar por mais de uma hora o período de incubação, devido às alterações causadas no citoplasma por condições de anaerobiose. O pH do tampão utilizado interferiu na atividade da enzima, ocorrendo um aumento linear da atividade da enzima redutase de nitrato com a elevação do pH do tampão fosfato de 4,5 até 7, havendo um declínio acentuado na atividade em pH acima de 7 (Figura 1 B). Dessa forma, o pH ótimo para folhas de pupunheira, no qual a enzima expressa sua máxima atividade, ficou estabelecido entre 6,5 a 7. Resultados semelhantes foram encontrados em *Cocos nucifera* (SHIVASHANKAR & RAMADASAN, 1983) e também em espécies, tais como *Coffea arabica* (CARELLI et al., 1990), *Avena strigosa* (OLIVEIRA et al., 1996) e *Ananas comosus* (NIEVOLA & MERCIER, 2001). O efeito do pH do meio de reação na atividade da redutase de nitrato tem sido associado a alterações na estrutura molecular da enzima ou a modificações na velocidade de translocação de íons nitrato e nitrito, através das membranas celulares (PRAKASHI & NAIR, 1982; CARELLI & FAHL, 1991).

A atividade da enzima foi expressiva quando não foi fornecido nitrato externo (Figura 1 C). Nesta condição, a atividade da enzima foi maior quando comparada com o nível de nitrato externo acima de 50mmol L<sup>-1</sup>, sugerindo a utilização da reserva de nitrato dos tecidos foliares. SOUSA (1994) obteve resultados semelhantes em plantas de *Lycopersicon esculentum*, nas quais a atividade da enzima foi alta quando não foi fornecido nitrogênio exógeno. Este fato provavelmente explica a atividade da enzima observada em tempo superior a 90 minutos de incubação. Considerando que a redutase de nitrato é uma enzima cuja síntese e atividade é induzida pelo substrato (BEEVERS & HAGEMAN, 1969), é possível que o nitrato interno (substrato) não tenha limitado a atividade da enzima. Dessa forma, estabeleceu-se que a concentração ótima de nitrato para a incubação de folhas de pupunheira está em torno de 25mmol L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Quando a concentração de nitrato externo foi superior a 25mmol L<sup>-1</sup>, houve decréscimo na atividade da enzima, especialmente em concentrações acima de 50mmol L<sup>-1</sup>, indicando um efeito deletério do excesso de substrato sobre atividade da enzima. Não obstante, alguns autores verificaram atividade máxima da enzima em concentração de nitrato em torno de 100mmol L<sup>-1</sup> (OLIVEIRA et al., 1996; DELÚ-FILHO et al., 1998; NIEVOLA & MERCIER, 2001). No entanto, MAGALHÃES et al. (1976) sugeriram que a concentração adequada para indução e manutenção da atividade da enzima está em torno de

50mmol L<sup>-1</sup> para a maior parte das espécies estudadas. Dada a variação dos resultados reportados na literatura, sugere-se a adequação do método de análise da atividade da enzima para cada espécie, para obtenção de protocolo confiável e reproduzível.

A variação da atividade da enzima redutase de nitrato em função da temperatura de incubação é apresentada na figura 1 D, onde se verificou aumento na atividade até temperatura de 35°C, sendo então considerada a temperatura ótima para o ensaio com pupunheira. Em tecidos vegetais que permaneceram incubados em temperaturas abaixo ou acima de 35°C houve decréscimo da atividade da enzima. O decréscimo da atividade da redutase nitrato em temperatura de incubação acima de 40°C pode estar associado aos processos de desnaturação da enzima e alterações na permeabilidade das membranas celulares, conforme sugerido por MEGURO & MAGALHÃES (1982) e QUEIROZ et al. (1991). A maior atividade da enzima em temperaturas em torno de 36°C, pode estar relacionada à origem da pupunheira, visto ser uma planta tropical, adaptada à temperatura superior a 30°C. Temperaturas de incubação entre 30 e 35°C também foram ideais para medidas da atividade da redutase de nitrato em abacaxizeiro (NIEVOLA & MERCIER, 2001). Por outro lado, para espécies de clima temperado, a temperatura ótima de incubação para atividade da enzima redutase de nitrato esteve em torno de 30°C (QUEIROZ et al., 1993; NIEVOLA & MERCIER, 2001).

A atividade da enzima redutase de nitrato foi significativamente maior para as folhas nas duas idades avaliadas, quando comparada a das raízes. No entanto, as folhas das plantas mais jovens (9 meses) apresentaram maior atividade que as folhas das plantas com 12 meses de idade. Independentemente da idade das mudas, as raízes mostraram menor atividade da enzima (Figura 2), evidenciando ser a folha o principal sítio ativo para redução do nitrato em pupunheira. Em outras espécies lenhosas, pode-se observar maior atividade desta enzima nas folhas (SMIRNOFF et al., 1984), o mesmo não aconteceu para o cafeeiro que apresentou maior redução do nitrato nas raízes (CARELLI et al., 1990).

Verificou-se variação na atividade da enzima em função das horas do dia, não sendo significativas as diferenças entre as folhas de mudas com idades de 9 e 12 meses (Figura 3 A). No início do período luminoso (7 horas) a atividade da enzima foi maior, quando comparada com o período da tarde (13 e 17 horas). A atividade máxima da enzima foi às 10 horas, após três horas do início do período luminoso. Passado esse horário, verificou-se declínio na atividade da enzima, tendo a menor atividade às 13 horas para as plantas de 12 meses, mas com valores médios das duas idades

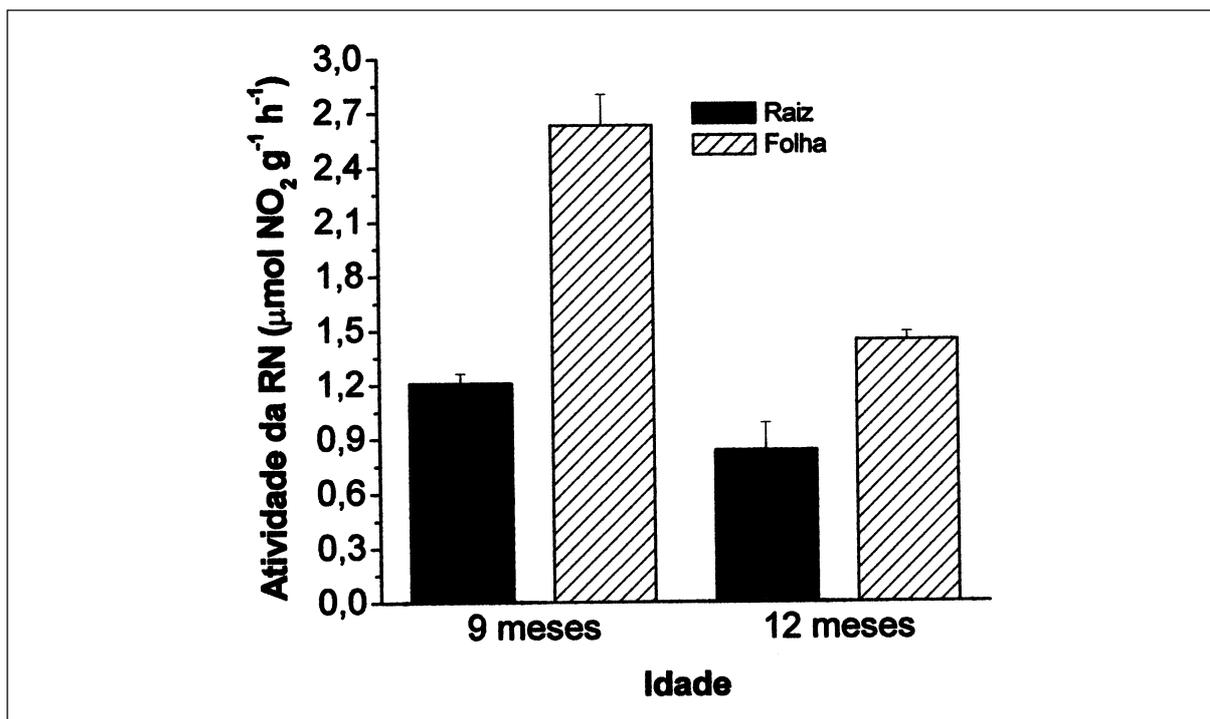


Figura 2 - Atividade da redutase de nitrato (RN) em folhas e raízes de pupunheira, nas idades de nove e doze meses.

semelhantes para os horários de coleta de 13 e 17 horas. O aumento na atividade da enzima nas primeiras horas de radiação está relacionado, possivelmente, ao efeito da luz sobre a enzima. Esse efeito pode ser direto, ativando a enzima, ou indireto, através do processo da fotossíntese, fornecendo energia para a assimilação do nitrato (SMIRNOFF & STEWART, 1985), porque a enzima redutase de nitrato utiliza o NADH do citosol como cofator (MEGURO & MAGALHÃES, 1982), que se apresenta mais disponível na presença de luz. Na coleta das 13 horas, especialmente nas plantas maiores (12 meses de idade) ocorreu queda significativa na atividade da redutase de nitrato. Neste horário, há, geralmente, maior intensidade de radiação solar e temperatura do ar mais elevada. Intensidade luminosa e temperatura acima do ótimo da enzima podem inibir a ação da redutase de nitrato (MAGALHÃES et al., 1976) diminuindo sua atividade. PEREIRA-NETTO et al. (1998) mostraram que variações na temperatura e na intensidade de radiação solar induziram mudanças na atividade da redutase nitrato em *Pueraria lobata*. Esta resposta da enzima à intensidade luminosa parece ser uma característica da redutase de nitrato, pois em outras espécies foram verificadas respostas semelhantes (MEGURO & MAGALHÃES, 1982; QUEIROZ et al., 1993; OLIVEIRA & PEREIRA-NETTO, 1993; DELÚ-FILHO et al., 1998; NIEVOLA & MERCIER, 2001). Interessante destacar que também a taxa de fotossíntese

apresenta um padrão de resposta semelhante ao da atividade da enzima, ou seja, a fotossíntese máxima para a pupunheira ocorre ao redor das 10 horas, decaindo no período da tarde (TUCCI, 2004).

O valor do potencial de água nas folhas as 7h foi em torno de  $-0,8\text{MPa}$  para folhas de plantas das duas idades (9 e 12 meses), apresentando redução significativa até as 13h, quando o potencial foi  $-1,3\text{MPa}$  para plantas com 9 meses de idade e  $-1,2\text{MPa}$  para as pupunheiras com 12 meses (Figura 3 B). Essa redução correspondeu a 65% do valor inicial. Os resultados apresentados na figura 3 B sugerem uma forte relação entre queda da atividade da redutase nitrato e potencial da água abaixo de  $-1,1\text{MPa}$ . De fato, outros autores também observaram queda da atividade desta enzima com a queda no potencial da água na folha (SINGH & SAHAY, 1991). Menor potencial de água em torno das 13 horas pode estar relacionado a maior transpiração da folha (RAJAGOPAL et al., 1977). Em pupunheira, sob condições naturais e em dias ensolarados, foram verificadas quedas no potencial da água da folha, na transpiração e na condutância estomática após as 10h (TUCCI, 2004), atingindo valores mínimos entre 13 e 14h. A queda da transpiração causa um menor influxo de nitrato, podendo afetar a atividade da redutase de nitrato (PLHAK, 2003). A partir das 16h ocorreu recuperação total do potencial de água

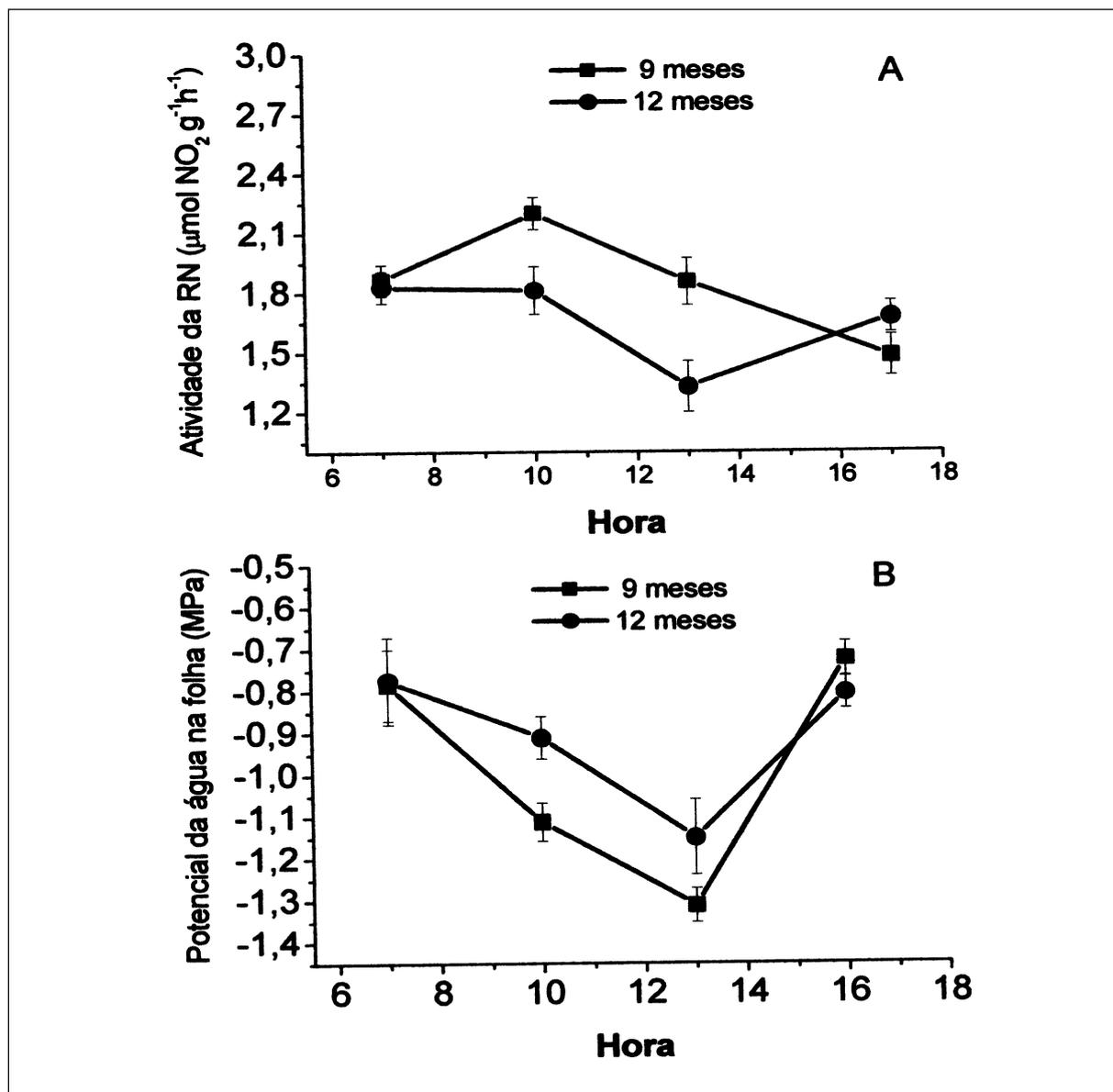


Figura 3 - Variação da atividade (A) de enzima redutase de nitrato (RN) e do potencial de água (B) em folhas de pupunheira de nove e doze meses, em função das horas do dia.

nas folhas de plantas das duas idades (Figura 3 B). Resultados similares a estes foram obtidos por MACHADO et al. (2002) com plantas jovens de laranjeiras. O autor relatou potencial de água na folha de  $-1,2\text{MPa}$  em torno das 13 horas. Já em pesquisas realizadas com plantas de pupunheira com 12 meses de idade, o potencial de água nas folhas em torno de  $-1,5\text{MPa}$  reduziu as taxas de trocas gasosas em 50% (OLIVEIRA et al., 2002). Segundo HSIAO (1973), a síntese da redutase de nitrato pode

ser inibida mesmo com breve período de balanço hídrico negativo.

#### CONCLUSÕES

A atividade da enzima redutase de nitrato em mudas de pupunheira pode ser determinada com as seguintes condições: tempo de incubação ao redor de 60 minutos; pH do tampão fosfato de 7; temperatura de incubação de 35 a 37°C; e concentração de nitrato

entre 28 a 30mmol L<sup>-1</sup>. A máxima atividade da enzima é obtida às 10 horas. Independentemente da idade das plantas, as folhas demonstram ser o principal sítio de atividade da redutase de nitrato. A luz e o estado hídrico da planta modelam a atividade da enzima redutase de nitrato.

#### AGRADECIMENTOS

À Nadir da Silva e ao oficial de apoio Antônio Buratto (ambos *in memoriam*), pelo auxílio prestado na execução do experimento.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEEVERS, I.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plant. **Annual Review of Plant Physiology**, Saskatchewan, v.20, p.495-522, 1969.
- BOVI, M.L.A. Cultivo racional de palmito. **Comunicação da Pesquisa Agropecuária**, São Paulo, v.11, p.16-18, 1993.
- CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Distribuição da assimilação do nitrato e da matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v.50, p.29-37, 1991.
- CARELLI, M.L.C. et al. Atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de plantas de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.13, p.119-123, 1990.
- DELÚ-FILHO, D.N. et al. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg): Otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, v.21, p.329-336, 1998.
- HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.24, p.519-570, 1973.
- JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Londres, v.43, p.1274-1279, 1971.
- JONES, R.W.; SHEARD, R.W. Conditions affecting *in vivo* nitrate reductase activity in chlorophyllous tissues. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.55, p.896-901, 1977.
- L'VOV, N.P.; SAFARALIEV, P.M. Methods of determining nitrate reductase activity in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 35, p.196-200, 1988.
- LEE, H.J.; TITUS, J.S. Factors affecting the *in vivo* nitrate reductase assay from MM106 apple trees. **Communications of Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.23, p.981-991, 1992.
- MACHADO, E.C. et al. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e do potencial da água na folha de laranjeira "Valência". **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p.53-58, 2002.
- MAGALHÃES, A.C. et al. Influência of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (*Glycine max* L.) seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.58, p.12-16, 1976.
- MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, p.249-257, 1982.
- NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H. Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.– Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, p.295-301, 2001.
- OLIVEIRA, M.A.J.; PEREIRA-NETTO, A.B. Aspectos ecológicos da redutase de nitrato em *Aspidosperma polyneuron* e *Croton urucurana*. Anais do **Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, v.5, p.79,1993.
- OLIVEIRA, M.A.J. et al. Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p.59-63, 2002.
- OLIVEIRA, M.A.J. et al. Padronização das condições de ensaio "*in vivo*" da redutase de nitrato (EC 1.6.6.1) em aveia preta (*Avena strigosa* Schreb). **Científica**, Barra Mansa, v.24, p. 215-224, 1996.
- PLHAK, F. Nitrogen supply through transpiration mass flow can limit nitrogen nutrition of plants. **Plant Soil and Environment**, Praha, v.49, p.473-479, 2003.
- PEREIRA-NETTO, A.B. et al. Nitrate reductase activity in field-grown *Pueraria lobata* (Kudzu) in southeastern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p.1971-1975, 1998.
- PRAKASHI, S.S ; NAIR, M.S. Regulation of *in vivo* assay of nitrate reductase in wheat leaves. **Plant Science Letter**, Oxford,v.34, p.25-34,1982.
- QUEIROZ, C.G.S. et al. Efeito do cloranfenicol, n-propanol, pH e temperatura sobre a atividade *in vivo* da redutase do nitrato em cafeeiros jovens. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.14, p.73-77, 1991.
- QUEIROZ, C.G.S. et al. Ritmo diurno na atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, p.787-795, 1993.
- RAJAGOPAL, V. et al. Diurnal fluctuations in relative water content, nitrate reductase and proline content in water-stressed and non stressed wheat. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 40, p.69-71, 1977.
- SCHOLANDER, P.F. et al. Gas exchange in root of mangroves. **American Journal of Botany**, New York, v. 42, p.92-98, 1965.
- SHIVASHANKAR, S.; RAMADASAN, A. Nitrate reductase activity in coconut leaves. **Journal of Science and Food Agriculture**, Bombain, v.34, p.1179-184, 1983.
- SINGH, D.; SAHAY, R.K. Critical leaf-water potential in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.61, p.822-825, 1991.

SMIRNOFF, N.; STEWART, G.R. Nitrate assimilation and translocation y higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 64, p.133-140, 1985.

SMIRNOFF, N. et al. The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.54, p.363-374, 1984.

SOUSA, V.F. **Influência de fatores na expressão da atividade da redutase de nitrato em tomateiro**

(*Lycopersicon esculentum* M.). 1994. 116 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)- Curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa.

TUCCI, M.L.S. **Varição estacional do crescimento e de trocas gasosas em pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth)**. 2004. 180 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas.