

# REDUÇÃO DE NITRATO E ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO EM PLANTAS JOVENS DE *Hevea brasiliensis* CULTIVADAS SOB NÍVEIS CRESCENTES DE NITRATO<sup>1</sup>

Nelson Delú Filho<sup>2</sup>, Luiz Edson Mota de Oliveira<sup>3</sup>, José Donizeti Alves<sup>4</sup> e Antônio Álvaro Corsetti Purcino<sup>5</sup>

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, C.P. 37, Lavras, MG, 37200-000, Brasil.

**RESUMO** - As atividades da redutase do nitrato (RN), sintetase da glutamina (GS), sintase do glutamato (GOGAT) e desidrogenase do glutamato (GDH) foram avaliadas em lâminas foliares e raízes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) com 7 meses de idade, cultivadas em solução nutritiva contendo 0, 1 ou 12 mM de nitrato. O aumento no suprimento de nitrato aumentou a atividade da redutase do nitrato nas raízes e da glutamina sintetase, glutamato sintase e glutamato desidrogenase nas folhas de plantas jovens de seringueira. A redução do nitrato parece ocorrer basicamente no sistema radicular, já que não se conseguiu detectar atividade da redutase do nitrato na parte aérea. Por outro lado, a atividade das enzimas de assimilação de amônio foi significativamente mais alta nos tecidos foliares, indicando que as folhas são os principais sítios de incorporação de amônio em aminoácidos. Essas observações sugerem que a seringueira possui mecanismos para transportar o nitrogênio reduzido das raízes até as folhas antes de sua incorporação em aminoácidos.

**Termos adicionais para indexação:** desidrogenase do glutamato, redutase do nitrato, seringueira, sintetase da glutamina, sintase do glutamato.

## NITRATE REDUCTION AND AMMONIUM ASSIMILATION IN *Hevea brasiliensis* GROWN UNDER INCREASING LEVELS OF NITRATE

**ABSTRACT**- The activities of nitrate reductase (RN), glutamine synthetase (GS), glutamate synthase (GOGAT) and glutamate dehydrogenase (GDH) were evaluated in the leaves and roots of seven month old rubber tree plants, cultivated in nutrient solutions with 0, 1 and 12 mM nitrate. High nitrate levels caused high NR activity in roots and high activity of GS, GDH and GOGAT in leaves of young rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Nitrate reduction seemed to occur basically at the roots, and no activity was detected in the shoot. Enzymes related to the assimilation of ammonium occurred mainly in the leaves. These observations suggest that the rubber tree has a mechanism to transport reduced nitrogen from the roots to the leaves where it is incorporated in aminoacids.

**Additional index terms:** glutamate dehydrogenase, glutamate synthase, glutamine synthetase, nitrate reductase.

<sup>1</sup> Recebido em 18/03/1996 e aceito em 18/09/1998. Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Lavras para obtenção do título de MS em Fisiologia Vegetal.

<sup>2</sup> Eng. Agr. MS, Depto de Biologia Vegetal, UFV, Viçosa, MG, 36571-000

<sup>3</sup> Prof. Titular, Depto de Biologia, UFLA, C.P. 37, Lavras, MG, 37200-000

<sup>4</sup> Prof. Adj. Depto de Biologia, UFLA, C.P. 37, Lavras, MG, 37200-000

<sup>5</sup> Pesq. Ph.D, Bolsista do CNPq, CNPMS/Embrapa, C.P. 151, Sete Lagoas, MG, 35701-970



## INTRODUÇÃO

Em cultivos comerciais, as plantas adquirem o nitrogênio principalmente pela absorção do nitrato pelas raízes, exceto aquelas que apresentam associações simbióticas com bactérias do gênero *Rhizobium*. Na célula, o nitrato é reduzido a nitrito e, em seguida, a amônio pelas enzimas redutases do nitrato e do nitrito, respectivamente. A seguir, o amônio é incorporado em aminoácidos pela ação conjunta das enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintetase do glutamato (GOGAT).

As propriedades bioquímicas da GS, particularmente sua alta afinidade pelo amônio (em comparação com a GDH) (O'Neal & Joy, 1974) e a localização de substancial proporção dessa enzima nos cloroplastos (O'Neal & Joy, 1973) ou nos plastídeos das raízes (Mifflin, 1974), sugerem importante participação GDH no processo assimilatório. Isto foi reforçado pela descoberta de Lea & Mifflin (1974) de uma rota alternativa de produção de glutamato (GLU), através da detecção da atividade da GOGAT em plantas superiores. Posteriormente, ficou demonstrado que a rota GS/GOGAT era a principal via de assimilação do amônio (Mifflin & Lea, 1976).

A GS catalisa a conversão do aminoácido GLU para a amida glutamina (GLN). Esta reação requer, além do GLU e do amônio, ATP e um cátion divalente como cofator (Mifflin *et al.*, 1981). Nas folhas coexistem duas isoformas de GS, uma citosólica (GS<sub>1</sub>) e outra cloroplastídica (GS<sub>2</sub>) (McNally & Hirel, 1983).

A GOGAT catalisa a transferência redutiva do N-amídico da GLN para o 2-oxoglutarato, para formar dois GLU (Wightman & Forest, 1978). Em folhas, a maior porção da enzima encontra-se localizada nos cloroplastos, sendo a ferredoxina o principal redutor da reação, enquanto que a forma dependente do NADPH encontra-se em porções reduzidas (Wallsgrave *et al.*, 1982). A terceira forma conhecida da enzima está presente nas células das raízes e utiliza o NADH como agente redutor (Oaks & Hirel, 1985).

A produção líquida de GLU, entretanto, é idêntica à reação catalisada pela GDH, já que a incorporação de amônio a aminoácido via GDH resulta na produção de uma molécula de GLU, a partir de 2-oxoglutarato, amônio e NADH ou NADPH. A GDH está localizada nas mitocôndrias de folhas e raízes (Emes & Fowler, 1979; Mifflin, 1974; Suzuki *et al.*, 1981) e, possivelmente associada à membrana mitocondrial (Yamaya *et al.*, 1984). A atividade da GDH é ainda controlada pela presença de Ca<sup>2+</sup> e NADH (Oaks & Hirel, 1985). Em um experimento com células de raízes de cenoura, Robinson *et al.* (1991) demonstraram que a GDH é ativa na oxidação do GLU mas não na aminação redutiva do 2-oxoglutarato.

Por apresentar um Km relativamente alto para o amônio, a GDH não poderia competir com a GS pelo cátion disponível. Porém, Pahlich & Gerlitz (1980) encontraram um Km bifásico e dependente da concentração de amônio, sugerindo que o argumento anterior pode não ser válido, uma vez que durante o processo

fotorrespiratório, no qual duas moléculas de glicina reagem para formar uma molécula de serina, produzindo também CO<sub>2</sub>, amônio e NADH, a matriz mitocondrial torna-se um ambiente com elevadas concentrações de amônio, o que favorece a atividade da GDH (Yamaya *et al.*, 1984). Além disso, a mitocôndria compartimentaliza a GDH, permitindo assim, que ela possa competir com sucesso com a GS pelo amônio disponível.

O presente trabalho teve como objetivos identificar e caracterizar a atividade das enzimas GS, GOGAT e GDH em diferentes partes da planta de seringueira em função do fornecimento de nitrato.

## MATERIAL E MÉTODOS

As plantas foram obtidas a partir de sementes ilegítimas do clone RRIM 600, coletadas em março de 1993. As sementes foram germinadas em canteiros de areia e protegidas contra radiação solar direta por uma palhada de capim, sendo efetuadas 3 irrigações diárias. Ao atingirem o estágio de "palito", as plântulas foram agrupadas de acordo com a uniformidade das raízes e da parte aérea. Em seguida, cada conjunto uniforme de 4 plântulas foi transferido para vasos plásticos de 3,0 L, contendo areia lavada como suporte de cultivo. Após o transplante, cada vaso recebeu 1,15 L de solução nutritiva modificada de Bolle-Jones (1957), pH 6,5. Sob cada vaso foi colocado um prato para coletar o volume excedente de 400 mL de solução nutritiva, previamente determinado em ensaio preliminar. Diariamente, o volume dos pratos era completado com água desionizada. Ao final de cada semana, antes de proceder à troca da solução nutritiva e após a operação anterior ter sido concluída, os vasos eram irrigados com água em abundância com o objetivo de evitar uma possível salinização do meio de cultivo.

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e ao atingirem 7 meses de idade, os tratamentos de 0, 1 e 12 mM nitrato no meio de cultivo foram impostos por 58 dias por meio de solução nutritiva. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Vários ensaios preliminares foram realizados a partir do protocolo básico descrito por Hageman & Reed (1980), para se otimizar as condições do ensaio *in vitro* da redutase do nitrato para folhas e raízes de seringueira. Baseado nos resultados obtidos nesses ensaios preliminares, a atividade da redutase do nitrato experimental foi determinada em material colhido às 8:00 h, em meio de incubação constituído de tampão fosfato 100 mM, 100 mM de KNO<sub>3</sub> e 5% n-propanol, pH 7,5, temperatura de 30°C e durante 60 min (Delú-Filho *et al.*, 1997).

O material vegetal utilizado era composto de raízes laterais ou lâminas foliares sem a nervura central, colhido às 8:00 h, lavado em água desmineralizada,



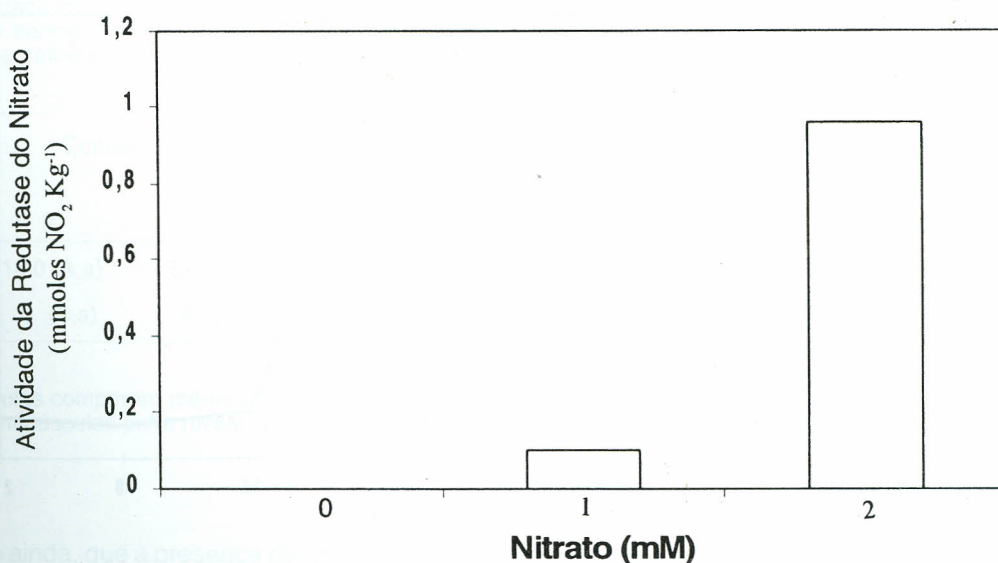


FIGURA 1 - Efeito do aumento da concentração do nitrato no meio de ensaio sobre a atividade da redutase do nitrato (RN) em raízes de plantas jovens de seringueira.

mediatamente envolvido em gase e congelado em N<sub>2</sub> líquido até determinação das atividades enzimáticas. Os extratos brutos foram obtidos pela maceração de 1,0 g de folhas em 4 volumes ou de 1 g de raízes em 2 volumes de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, contendo 2 mM de DTT, 1 mM de PMSF e 10% (m/v) de PVPP. Em seguida, foram submetidos a uma centrifugação a 16.600 *g*, por 15 min e o sobrenadante foi utilizado como fonte de extrato enzimático bruto. A temperatura de todos os equipamentos e soluções utilizadas durante os ensaios foi mantida abaixo de 4°C.

Para o ensaio da GS, adicionaram-se 300 µL do extrato bruto a 700 µL de um meio constituído de tampão Tris-HCl 100mM, pH 7,5, 10 mM de 2-mercaptoetanol, 40 mM de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mM de NH<sub>2</sub>OHCl, 10mM de ATP, 50 mM de GLU. Incubou-se a mistura durante 30 minutos, sendo a reação paralisada pela adição de 1,0 mL de uma solução contendo 0,37 M de FeCl<sub>3</sub>, 0,37 M de HCl e 0,20 M de TCA. Após centrifugação a 2800 *g*, por 15 minutos, o quelato Fe-L-glutamil-γ-hidroxiato (GHA) produzido foi quantificado espectrofotometricamente a 540 nm (Ratajczack *et al.*, 1981).

A atividade da GDH foi determinada adicionando-se 50 µL do extrato bruto a um meio constituído de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, 100 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM de 2-oxoglutarato e 4 mM de CaCl<sub>2</sub>. Essa mistura foi incubada, por 3 min, a 30°C, adicionando-se a seguir 0,20 mM de NADH. O monitoramento da oxidação do NADH foi realizado em 340 nm.

A extração da enzima GOGAT foi realizada macerando-se os tecidos vegetais em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, contendo 2 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 10% de PVPP (m/v) e 1 mM de EDTA, à temperatura de

4° C. Após centrifugação (como descrito anteriormente), o sobrenadante foi acondicionado em tubos de ensaio e mantido em gelo.

Para o ensaio da Fd-GOGAT adicionaram-se 300 µL do extrato bruto obtido das folhas em 900 µL de um meio constituído de tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, 15 mM de GLN, 15 mM de 2-oxoglutarato e 200 µL de metil viologênio (2 g L<sup>-1</sup>). Essa mistura foi incubada por 2 minutos a 30°C e foram adicionados 300 µL de uma solução contendo 16 mg de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e 16 mg de NaHCO<sub>3</sub> por mL de água destilada. A reação foi paralisada após 20 minutos, imergindo-se os tubos de reação em água fervente por 2 minutos, seguida de imediata agitação em vortex até o desaparecimento da cor azul e posterior resfriamento em gelo. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi centrifugado a 18.000 *g*, durante 5 minutos. Do sobrenadante retirou-se uma alíquota de 1 mL a qual foi cromatografada em uma coluna de DOWEX 1-8X na forma acética. Após lavagem da coluna com 15 mL de água bidestilada, para remoção do excesso de GLN, o GLU formado durante a reação foi eluído da coluna com 7 mL de ácido acético 300 mM. Desse volume foram tomadas alíquotas de 1 mL para determinação colorimétrica do GLU pelo método de Yemm & Cocking (1955).

A atividade da NADH-GOGAT foi determinada adicionando-se 100 µL do extrato bruto obtido das raízes a 800 µL de um meio constituído de tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, 15 mM de GLN, 15 mM de 2-oxoglutarato, 10 mM de KCl e 20 mM de β-mercaptoetanol. Essa mistura foi incubada por 3 minutos a 30°C, adicionando-se a seguir 0,20 mM de NADH. Pelo decréscimo na concentração do NADH avaliado a 340 nm, determinou-se a atividade enzimática.



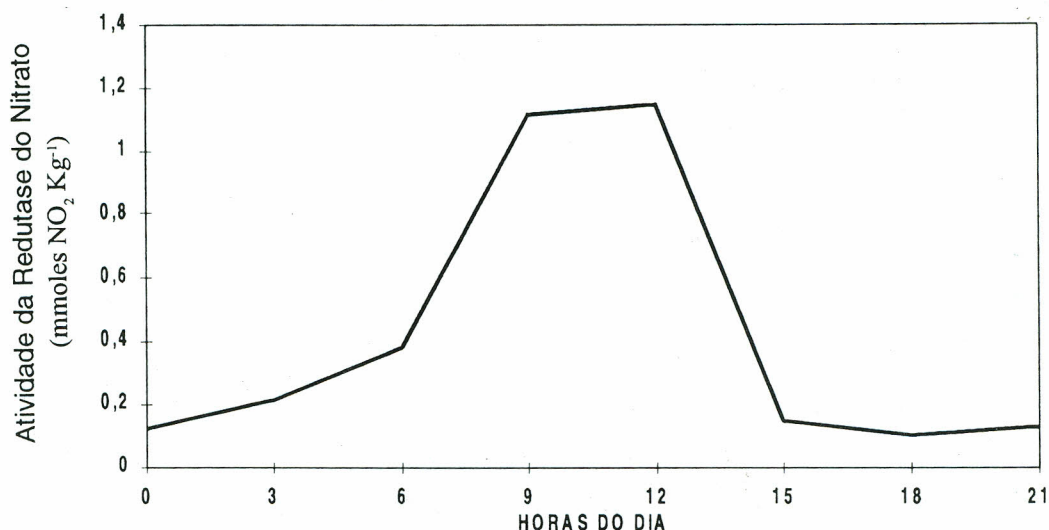


FIGURA 2 - Ritmo diurno da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios *in vivo* realizados nos caules, pecíolos e lâminas foliares das plantas jovens de seringueira não foi detectada atividade da redutase do nitrato. Nas raízes, a atividade da enzima foi induzida pelo aumento da concentração de NO<sub>3</sub> no meio de reação (Figura 1) e apresentou valores mais elevados entre 8:00 e 12:00 h (Figura 2). A partir das 15:00 h, a atividade da redutase do nitrato nas raízes diminuiu significativamente, mantendo valores muito baixos até que as folhas começassem a receber insolação na manhã seguinte (Figura 2). A ausência de nitrato no meio de cultivo está relacionada a níveis de atividade próximos de zero, considerando-se que a redutase do nitrato (RN) é uma enzima cuja síntese e atividade são induzidas pelo substrato (Beever & Hageman, 1969).

A atividade da GS em plantas jovens de seringueira foi detectada predominantemente nas lâminas foliares (Tabela 1). Observou-se, ainda, que o nitrato exerceu

um efeito positivo sobre a atividade da enzima, aumentando sua atividade em mais de cinco vezes. Em plantas anuais a atividade da GS parece ser estimulada tanto pelo suprimento de nitrato (Vézima & Langlois, 1989), como de amônio (Hoezle *et al.*, 1992), ou mesmo de N-orgânico (Laurie & Stewart, 1990; Tonin & Sodek, 1990; Junghans & Mosquim, 1995).

As menores atividades da GS observadas nas folhas nas concentrações 0 e 1 mM de nitrato (Tabela 1) podem ser resultantes do fornecimento de quantidades insuficientes de amônio para a enzima, como consequência da baixa atividade da redutase do nitrato nessas concentrações.

A atividade da Fd-GOGAT nas lâminas foliares foi significativamente maior que a atividade da NADH-GOGAT nas raízes (Tabela 2). Esses resultados e a baixa atividade da GS nas raízes (Tabela 1) indicam que, em plantas jovens de seringueira, a assimilação primária do amônio ocorre quase que integralmente na parte aérea.

TABELA 1 - Atividade da sintetase da glutamina em folhas e raízes de seringueiras cultivadas em três níveis de nitrato. Os valores referem-se a mmoles de GHA kg<sup>-1</sup> MF min<sup>-1</sup>.

Órgão	Concentração de nitrato (mM)		
	0	1	12
folha	1,8 (A,a)	3,8 (A,b)	10,0 (A,c)
raiz	0 (B,a)	0 (B,a)	0 (B,a)

As letras maiúsculas comparam médias dentro do mesmo nível de N e letras minúsculas entre níveis de N para um mesmo órgão.

TABELA 2 - Atividade da sintase do glutamato em folhas e raízes de seringueiras cultivadas em três níveis de nitrato. Os valores referem-se a mmoles de GLU kg<sup>-1</sup> MF min<sup>-1</sup>.

Órgão	Concentração de nitrato (mM)		
	0	1	12
folha (Fd-GOGAT)	12,0 (A,a)	58,0 (A,b)	77,0 (A,c)
raiz (NADH-GOGAT)	1,0 (B,a)	2,0 (B,a)	4,0 (B,a)

As letras maiúsculas comparam médias dentro do mesmo nível de N e letras minúsculas entre níveis de N para um mesmo órgão.



TABELA 3 - Atividade da desidrogenase do glutamato em folhas e raízes de seringueiras cultivadas em três níveis de nitrato. Os valores referem-se a  $\mu\text{moles de GLU g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$ .

Órgão	Concentração de nitrato (mM)		
	0	1	12
folha	10,0 (A,a)	57,0 (A,b)	78,0 (A,c)
raiz	0 (B,a)	2,0 (B,a)	4,0 (B,a)

As letras maiúsculas comparam médias dentro do mesmo nível de N e letras minúsculas entre níveis de N para um mesmo órgão.

Verificou-se ainda, que a presença de nitrato no meio de cultivo exerceu efeito positivo sobre a atividade da Fd-GOGAT, não apresentando, todavia, efeito significativo sobre a atividade da NADH-GOGAT. Os resultados encontrados na literatura relacionados com o efeito do nitrato sobre a atividade da GOGAT são contraditórios. Trabalhando com plântulas de mostarda, Hecht *et al.* (1988) verificaram que o nitrato exerceu influência positiva sobre a síntese *de novo* e a ativação da NADH-GOGAT, não apresentando qualquer efeito sobre a Fd-GOGAT. Em nódulos de alfafa, Groat & Vance (1981) notaram que o fornecimento exclusivo de nitrato inibia a atividade da NADH-GOGAT. Segundo Rhodes *et al.* (1976), o fornecimento de nitrato inibe a atividade da Fd-GOGAT em *Lemna minor*, ao passo que em cevada esse ânion não apresenta nenhum efeito sobre a atividade da enzima (Lewis *et al.*, 1982). Em cotilédones de soja, a NADH-GOGAT apresentou respostas variadas em função do fornecimento de diferentes fontes de N-orgânico (Junghans & Mosquim, 1995).

Nas plantas jovens de seringueira, a atividade da Fd-GOGAT observada na ausência de nitrato no meio de cultivo pode ser considerada expressiva, quando comparada com a atividade da enzima em outras espécies. Isso pode ser explicado pelo fato da Fd-GOGAT ser uma enzima ativa também no processo de reassimilação do amônio produzido durante a fotorrespiração (Ogren, 1984) ou daquele derivado da degradação de compostos nitrogenados presente nas células (Platt & Anthon, 1981).

A atividade da GDH foi significativamente maior nas folhas do que nas raízes de plantas jovens de seringueira, à semelhança do que ocorreu com a GS e Fd-GOGAT (Tabela 3). Observou-se ainda que o nitrato exerceu efeito positivo sobre a atividade da enzima na parte aérea, não tendo contudo, provocado qualquer estímulo na atividade medida nos tecidos radiculares. A exemplo da GOGAT, a resposta da GDH em função da aplicação de nitrogênio (nitrato ou amônio) parece não seguir um padrão definido (Groat & Vance, 1981; Peeters & Van Laere,

1992; Cammaerts & Jacobs, 1985; Srivastava & Singh, 1987).

O fato de plantas de seringueira apresentarem grande capacidade de assimilação do amônio nas lâminas foliares pode representar uma vantagem do ponto de vista ecofisiológico, uma vez que o amônio liberado durante o processo fotorrespiratório teria condições de ser reassimilado pela planta, reduzindo as perdas para o meio pela volatilização (Farquhar *et al.*, 1980).

## AGRADECIMENTOS

A Marlúcia Rocha e Silva e Edina Patto Pacheco de Pinho pela assistência nas determinações das atividades enzimáticas e ao Eng. Agr. Marcos Munhoz Blanco pela doação do material vegetal.

## REFERÊNCIAS

- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 20:495-522, 1969.
- BOLLE-JONES, E.W. Copper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and Soil**, 10(2):168-178, 1957.
- CAMMAERTS, D. & JACOBS, M.A. A study of the role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, 163(4): 517-526, 1985.
- DELÚ-FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M. & ALVES, J.D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, 21(3):329-336, 1997.
- EMES, M.J. & FOULER, M.W. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedlings pea roots. **Planta**, 194(1):249-253, 1979.
- FARQUHAR, G.D.; FIRTH, P.M.; WEELAR, R. & WEIR, B. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: determination on the ammonia compensation point. **Plant Physiology**, 66(4):710-714, 1980.
- GROAT, R.G. & VANCE, C.P. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfafa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, 67(6):1198-1203, 1981.
- HAGEMAN, R.H. & REED, A.J. Nitrate reductase from higher plants. **Methods in Enzymology**, San Diego, 69:270-280, 1980.
- HECHT, U.; OELMULLER, S.; SCHMIDT, S. & MOHR, H. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. **Planta**, 175(1):130-138, 1988.
- 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. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 7(1):67-74, 1995.
- LAURIE, S. & STEWART, G.R. The effects of compatible solutes on the stability of glutamine synthetase from chickpeas grown under different nitrogen and temperature regimes. **Journal of Experimental Botany**, 41(227):1415-1422, 1990.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. **Nature**, 251(2):614-620, 1974.
- LEWIS, O.A.M.; JAMES, D.M. & HEWITT, E.J. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. **Annals of Botany**, 49(1):39-49, 1982.
- McNALLY, S. & HIREL, B. Glutamine synthetase isoforms in higher plants. **Physiologie Végétale**, 21:761-774, 1983.
- MIFLIN, B.J. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. **Plant Physiology**, 44(2):550-555, 1974.



- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, 28:299-329, 1976.
- MIFLIN, B.J.; WALSGROVE, R.M. & LEA, P.J. Glutamine metabolism in higher plants. **Current Topics Cellular Regulation**, 20(1):1-43, 1981.
- OAKS, A. & HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, 36:345-365, 1985.
- O'NEAL, D. & JOY, K.W. Localization of glutamine synthetase in chloroplasts. **Nature**, 246(3):61-62, 1973.
- OGREN, W.L. Photorespiration: pathways, regulation, and modification. **Annual Review of Plant Physiology**, 35:415-442, 1984.
- O'NEAL, D. & JOY, K.W. Glutamine synthetase of pea leaves. **Plant Physiology**, 54(3):773-779, 1974.
- PAHLICH, E. & GERLITZ, C. Deviations from Michaelis-Menten behaviour of plant glutamate dehydrogenase with ammonium as a variable substrate. **Phytochemistry**, 19(1):11-13, 1980.
- PLATT, S.G. & ANTHON, G.E. Ammonium accumulation and inhibition of photosynthesis in methionine sulfoximine treated spinach. **Plant Physiology**, 67(2):509-513, 1981.
- RHODES, D.; SIMS, A.P. & STEWART, G.R. Glutamine synthetase and the control of nitrogen metabolism in *Lemna minor* L. In: HEWITT, E.J. (ed). **Nitrogen assimilation of plants. Proceedings of the Long Ashton Research Station Symposium**. New York, 1976. 501-520.
- ROBINSON, S.A.; SLADE, A.P.; FOX, G.G.; PHILIPS, R.; RATCLIFFE, R.G. & STEWART, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. **Plant Physiology**, 95(2), 509-516, 1991.
- SRIVASTAVA, H.S. & SINGH, R.P. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. **Phytochemistry**, 26(2):597-610, 1987.
- SUZUKI, A.; GADAL, P. & OAKS, A. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. **Planta**, 151(2):457-461, 1981.
- TONIN, G.S. & SODEK, L. Asparaginase, allantoinase and glutamine synthetase activities in soybean cotyledons grown "in vitro". **Phytochemistry**, 29(2):2829-2831, 1990.
- VÉZIMA, L.P. & LANGLOIS, J.R.. Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. **Plant Physiology**, 90(6):1129-1133, 1989.
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. **Planta**, 154(2):473-476, 1982.
- WIGHTMAN, F. & FOREST, J.C. Properties of plant aminotransferase. **Phytochemistry**, 17:1455-1472, 1978.
- YAMAYA, T.; OAKS, A. & MATSUMOTO, H. Characteristics of glutamate dehydrogenase in maize roots. **Plant Physiology**, 76(4):1009-1013, 1984.
- YEMM, E.W. & COCKING, E.C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, 80(2):209-213, 1955.