



Absorcao e translocacao de  
1996 TS - T.05/96



3123 - 1

**ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DE NITROGÊNIO POR  
PLANTAS DE MILHO (*Zea mays*, L.) SUBMETIDAS A  
PERÍODOS CRESCENTES DE OMISSÃO DE  
FÓSFORO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA**

T  
05/96

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "*Magister Scientiae*".

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

ABRIL - 1996

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M188a  
1996

Magalhães, Jurandir Vieira de, 1968-

Absorção e translocação de nitrogênio por plantas de milho  
(*Zea mays*, L.) submetidas a períodos crescentes de omissão de  
fósforo na solução nutritiva / Jurandir Vieira de Magalhães. –  
Viçosa : UFV, 1996.  
76p. : il.

Orientador: Roberto Ferreira de Novais.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

1. Milho - Adaptação (Fisiologia). 2. Milho - Absorção de  
nitrogênio. 3. Milho - Interações de nutrientes. 4. Milho - Nu-  
trição mineral. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD.18.ed. 581.13354

CDD.19.ed. 581.13354

EMBRAPA/DDT

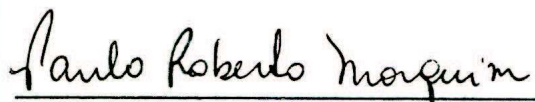
Valor Aquisição Cr\$	
Data Aquisição	29-06-96
N.º N.º Fiscal Fatura	
Formas de Pagamento	
N.º Ordem Compra	
Origem	doação
N.º do Tombo	7.14/96

JURANDIR VIEIRA DE MAGALHÃES

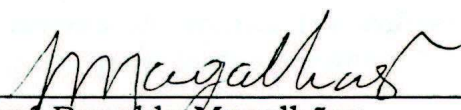
**ABSORÇÃO E TRANSLOCAÇÃO DE NITROGÊNIO POR  
PLANTAS DE MILHO (*Zea mays*, L.) SUBMETIDAS A  
PERÍODOS CRESCENTES DE OMISSÃO DE  
FÓSFORO NA SOLUÇÃO NUTRITIVA**


Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Curso de Solos e  
Nutrição de Plantas, para obtenção  
do título de "*Magister Scientiae*".

APROVADA: 30 de novembro de 1995.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Paulo Roberto Mosquim  
(Conselheiro)

  
\_\_\_\_\_  
Antônio Fernandino de Castro  
Bahia Filho  
(Eng. Agr. D.S.)

  
\_\_\_\_\_  
José Ronaldo Magalhães  
(Eng. Agr. Ph.D.)

  
\_\_\_\_\_  
Vera Maria Carvalho Alves  
(Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>. D.S. Co-Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Roberto Ferreira de Novais  
(Orientador)

À Altina e ao Zé Vieira,  
dedico esta tese.

*“Je vais fermer l’œil terrestre mais l’œil spirituel  
restera ouvert, plus grand que jamais. Je  
repousse les prières de toutes les églises. Je  
demande une prière pour toutes les âmes.”*

Victor Hugo



## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da EMBRAPA, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Professor Roberto Ferreira de Novais, pela liberdade, na qual sintetizo todos os demais agradecimentos.

À Pesquisadora Vera Maria Carvalho Alves, pela ousadia, traduzida em sua confiança e amizade.

Ao Professor Paulo Roberto Mosquim, pelo entusiasmo contagiante, tanto nas aulas quanto nas discussões científicas.

Ao Pesquisador Antônio Fernandino de Castro Bahia Filho, pela extrema sensibilidade, capaz de adequar pessoas a caminhos.

Ao Pesquisador José Ronaldo Magalhães, pela pronta acolhida em tempos difíceis, e pela profunda amizade.

Ao Pesquisador Carlos Alberto Vasconcelos, por ter feito a pergunta fundamental: por quê?

Ao Professor Vicente Wagner Dias Casali, pela direção, no início e também depois.

Ao Técnico do CNPMS Wagner Geraldo Campos, pela amizade, pela crença e, mais do que auxílio, pelo amparo.

Ao chefe do Setor de Laboratórios do CNPMS, Gilberto Silva, pelo apoio durante o trabalho.

Aos amigos do CNPMS que contribuíram diretamente para este trabalho: Gislene, Carla, Heloísa, José Geraldo e todos os demais.

Às bibliotecárias Vânia, Maria Tereza e Conceição pela simpatia e pelo auxílio sempre pronto.

Ao Fernando Palha Leite, pelo companheirismo e desenvoltura presentes durante o curso.

Ao Rodrigo Solha, grande amigo que, com sua visão realisticamente simples dos fatos, tornou leves momentos difíceis.

Às colegas Sideny, Rose, Andréia, Solange e Marlúcia, pela amizade e pelo apoio constantes.

À família, por ter tornado possível a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Jurandir Vieira de Magalhães, filho de Jurandir Raul de Magalhães e Glória Maria Vieira Magalhães, nasceu em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, em 23 de janeiro de 1968.

Realizou seus estudos de 1º e 2º graus em Belo Horizonte, MG. Iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de Viçosa em 1986, concluindo-o em 1991.

Em janeiro de 1991 iniciou aperfeiçoamento no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da EMBRAPA, concluindo-o em 1992.

Em março de 1993, iniciou o Curso de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas na Universidade Federal de Viçosa.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Absorção de Nitrato .....	3
2.2. Absorção de Amônio .....	7
2.3. Redução do Nitrato e Assimilação do Amônio .....	11
2.4. Suprimento de Nitrato x Amônio .....	12
2.5. Deficiência de Fósforo x Absorção e Metabolismo de Nitrogênio .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Obtenção do Material Vegetal .....	19
3.2. Cinéticas de Absorção de Nitrato e de Amônio .....	20
3.3. Translocação de Nitrogênio .....	22
3.4. Análise do Tecido Vegetal .....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
4.1. Produção de Matéria Seca, Teores de Fósforo Total e Nitrogênio Total na Parte Aérea e Raízes de Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva .....	24



4.2. Absorção de Nitrato por Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva .....	28
4.3. Absorção de Amônio por Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva .....	37
4.4. Produção de Exsudato do Xilema e Conteúdo de Nitrogênio Total Translocado em Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva .....	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	55
6. RESUMO E CONCLUSÕES .....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
APÊNDICE .....	73

## EXTRATO

MAGALHÃES, Jurandir Vieira de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 1996. **Absorção e translocação de nitrogênio por plantas de milho (*Zea mays*, L.) submetidas a períodos crescentes de omissão de fósforo na solução nutritiva.** Professor Orientador: Roberto Ferreira de Novais. Co-Orientadora: Vera Maria Carvalho Alves. Professor Conselheiro: Paulo Roberto Mosquim.

Os experimentos deste trabalho foram conduzidos em casa de vegetação e câmara de crescimento. Sete dias após o transplântio, plantas do progenitor masculino do milho BR-201 foram submetidas à omissão de fósforo na solução nutritiva por dois, quatro, seis, oito e dez dias. Ao se completar cada um desses períodos, foram feitos estudos de cinética de absorção de nitrato e de amônio em plantas submetidas e não - submetidas à omissão prévia de fósforo, na presença e na ausência desse nutriente durante o período de cinética (9 horas), em câmara de crescimento. Ao final de cada cinética, as plantas foram colocadas em suas respectivas soluções iniciais. Após uma hora, essas foram cortadas 1 cm acima do colo, sendo recolhido o exsudato do xilema produzido por 30 minutos, ao final dos quais as plantas foram colhidas e divididas em parte aérea e raízes. Avaliaram-

se: produção de exsudato, conteúdo de nitrogênio translocado, peso de matéria seca da parte aérea e raízes, teores de fósforo e nitrogênio total na matéria seca. A omissão prévia de fósforo diminuiu a absorção tanto de nitrato quanto de amônio. A absorção de nitrato foi notadamente mais reduzida do que a absorção de amônio. O efeito da redução de absorção das duas formas de nitrogênio em função da omissão prévia de fósforo foi tanto maior quanto mais longo o período de omissão prévia desse nutriente. A presença de fósforo durante a cinética reverteu, parcialmente, o efeito de sua omissão prévia. A recuperação de absorção em função do ressuprimento foi tanto maior quanto menor o período de sua omissão prévia. A omissão prévia de fósforo diminuiu a produção de exsudato do xilema e a translocação de nitrogênio da raiz para a parte aérea. O ressuprimento de fósforo durante a cinética recuperou, parcialmente, essas características. A magnitude da recuperação dependeu do número de dias de omissão de fósforo aplicados previamente à cinética.



## ABSTRACT

MAGALHÃES, Jurandir Vieira de, M.S., Federal University of Viçosa, April 1996. **Nitrogen absorption and translocation by maize plants (*Zea mays*, L.) under increasing periods of phosphorus starvation in nutrient solution.** Adviser: Roberto Ferreira de Novais. Co-adviser: Vera Maria Carvalho Alves. Advisory committee member: Paulo Roberto Mosquim.

The experiments of this work were conducted in greenhouse and growth chamber. Seven days after the transplanting, male progenitor plants of the maize double cross BR - 201 were submitted to periods of phosphorus starvation in nutrient solution of 2, 4, 6, 8 and 10 days. After each one of this periods had been reached, nitrate and ammonium absorption kinetic studies were done in plants under prior phosphorus starvation and non starvation, in the presence and in the absence of phosphorus during the kinetic period (9 hours), in growth chamber. At the end of each kinetics, the plants were placed in their respective original solutions. After one hour, they were excised one centimeter above the root insertion, being withdrawn the xylem exudate produced for 30 minutes. After that the plants were harvested and splitted up in roots and aerial part. Exudate production, content of



nitrogen translocated, root and aerial part dry matter weight, phosphorus and nitrogen concentration in dry matter were evaluated. Prior phosphorus starvation reduced the absorption of both nitrate and ammonium. Nitrate absorption was markedly more reduced than ammonium absorption. The reduction of the absorption of both nitrogen forms caused by prior phosphorus starvation increased as the period of prior phosphorus starvation increased. The presence of phosphorus during the kinetics reverted, partially, the effect of prior starvation. Prior phosphorus starvation reduced xylem exudate production and nitrogen translocation from the roots to the aerial part. Phosphorus resupply during the kinetics recovered, partially, those characteristics. The magnitude of the recovering was a function of the phosphorus starvation period applied prior to the kinetics.

## 1. INTRODUÇÃO

Considerando-se a natureza dos solos brasileiros, os problemas relacionados à disponibilidade de fósforo assumem grande importância. Esses solos, altamente intemperizados, são freqüentemente ácidos, possuindo, na fração argila, teores elevados de óxidos de ferro e de alumínio. Essas características, que resultam em elevada capacidade de sorção de fósforo, aliadas à pobreza generalizada deste nutriente, justificam pesquisas que visam ao estudo da dinâmica do fósforo e aos efeitos do seu estresse no metabolismo vegetal. Essas pesquisas são importantes na busca de soluções que permitam superar ou minorar problemas causados pela baixa disponibilidade daquele nutriente nesses solos.

A deficiência de fósforo pode induzir deficiência de nitrogênio. A literatura relata redução nas taxas de absorção de nitrato em colza, cevada e trigo-mouro (SCHJØRRING, 1986), tabaco (RUFTY Jr. et al., 1990) e cevada (LEE, 1982; RUFTY Jr. et al., 1991) em condições de deficiência de fósforo. Considerando-se que situações de estresse de fósforo, em maior ou menor intensidade, são razoavelmente comuns em solos brasileiros, o estudo das distorções causadas na absorção e utilização do nitrogênio pelo suprimento inadequado de fósforo, mais do que o inverso, faz-se conveniente.

A obtenção de altas produtividades de milho é diretamente dependente de elevadas doses de adubos nitrogenados. Todavia, respostas aquém das expectativas, mesmo com altas doses daqueles adubos, podem advir da deficiência de fósforo interferindo na absorção e na eficiência de utilização do nitrogênio.

Ainda que com níveis supostamente adequados de fósforo, estresses ocasionais do nutriente, em virtude da queda do teor de umidade do solo a valores limitantes para difusão, são especialmente críticos em solos de cerrado. Nessa situação, observa-se uma paralisação da difusão de fósforo em teores de umidade do solo ainda distantes do ponto de murcha permanente, estando as plantas, portanto, ainda túrgidas (NOVAIS et al., 1990). Assim sendo, essas quedas dos teores de umidade podem restringir o transporte de fósforo (difusão) enquanto que, por não serem severas a ponto de limitar a transpiração, espera-se a persistência do fluxo de massa de nitrogênio.

Mesmo com o transporte de nitrogênio mantido em ocasiões de interrupção do transporte de fósforo para as raízes, torna-se necessário saber como ocorreria a absorção do primeiro nas ocasiões de deficiência daquele nutriente.

O objetivo deste trabalho foi identificar as principais alterações na absorção e translocação de nitrogênio em plantas de milho, ocasionadas pela omissão de fósforo, por diferentes períodos, no meio de cultivo.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Absorção de Nitrato

Estudos de absorção de  $\text{NO}_3^-$  indicam que o processo é bifásico (DODDEMA e TELKAMP, 1979). Em baixas concentrações externas ( $< 1 \text{ mol m}^{-3}$ ), atua um sistema de alta afinidade ("high-affinity transport system": HATS) que segue a cinética de saturação de Michaelis-Menten (SIDDIQI et al., 1990). À medida que a concentração externa de nitrato aumenta, entra em ação um segundo sistema, linearmente dependente dessa concentração. Porém, em altas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  ( $\geq 1 \text{ mol m}^{-3}$ ), a absorção pode ser saturável (DODDEMA e TELKAMP, 1979) ou não - saturável (SIDDIQI et al., 1990), dependendo da espécie ou genótipo. Esses autores observaram que o sistema HATS é induzido pelo pré-tratamento com o nutriente (sistema indutivo) e está sujeito à inibição do tipo *feedback*. O sistema de alta concentração não é estimulado pelo pré-tratamento com nitrato, sendo denominado sistema constitutivo. Em altas concentrações externas de nitrato, a absorção é resultante do somatório desses dois sistemas.



Explicando o papel do nitrato como indutor e inibidor negativo da própria absorção, SIDDIQI et al. (1989) propuseram que a máxima indução demandaria uma concentração citoplasmática crítica de nitrato nas raízes. Plotando-se o influxo de  $\text{NO}_3^-$  versus  $[\text{NO}_3^-]$  radicular, os autores obtiveram uma parábola. Até se atingir o pico de indução, o influxo foi positivamente relacionado com  $[\text{NO}_3^-]$  radicular. Subseqüentemente, o influxo declina e a  $[\text{NO}_3^-]$  radicular mostra efeito típico de *feedback* negativo sobre o mesmo. Portanto, segundo os autores, o efeito indutor do nitrato e o efeito inibitório mostram-se como processos independentes.

Além do próprio nutriente, outros fatores relacionados com a  $[\text{NO}_3^-]$  radicular, como produtos de sua assimilação, podem causar inibição do tipo *feedback*. Provavelmente, os aminoácidos exercem papel mais importante do que o nitrato no controle da absorção (LEE et al., 1992).

SIDDIQI et al. (1989) observaram que o transportador indutível, responsável pela absorção de nitrato, é extremamente lábil, decaindo poucas horas após a retirada do nutriente do meio externo. Além disso, a indução não é função somente da  $[\text{NO}_3^-]$  radicular, exigindo a presença externa de nitrato. A baixa liberação do nitrato vacuolar poderia acarretar uma "desindução" do sistema HATS.

Mesmo em plantas não expostas previamente a nitrato, o sistema indutivo pode estar presente, sendo, porém, responsável por influxos bem menores do que em plantas submetidas a pré-tratamento com o nutriente (SIDDIQI et al., 1990). Portanto, segundo esses autores, o baixo nível de absorção em plantas não induzidas (não pré-tratadas com nitrato) pode representar um baixo nível de expressão dos mesmos genes que seriam induzidos quando da exposição ao nitrato.

HOLE et al. (1990), mediante o uso de inibidores da síntese de proteínas em plantas de milho, concluíram que a regulação da indução do sistema de transporte deva ser em nível DNA. Na indução,



ocorre transição de um estado de baixo "influxo constitutivo" de nitrato (plantas não expostas recentemente ao nutriente e com sistema constitutivo ativo) para um estado de incrementação de influxo, em resposta à exposição a nitrato. A transição do estado de baixo para o de alto influxo, segundo os autores, é, aparentemente, dependente do DNA nuclear.

Visando à avaliação da dependência metabólica do influxo de nitrato, foram determinados os valores de  $Q_{10}$  para plantas de cevada, em condições de indução e não-indução (GLASS et al., 1990). Na concentração externa daquele nutriente correspondente ao sistema HATS, os efeitos de baixa temperatura e inibidores metabólicos são consistentes com a hipótese de ser esse um transporte ativo. Na faixa do sistema de alta concentração, somente em plantas não-induzidas os valores de  $Q_{10}$  foram aqueles esperados para transporte passivo (~1). Em plantas induzidas, esses valores, que ficaram em torno de 2, poderiam ser explicados, segundo os autores, pela contribuição do sistema de baixa concentração (devido ao pré-tratamento, indução, com nitrato). De qualquer modo, ainda há dúvidas quanto à natureza energética do transporte pelo sistema de alta concentração.

GLASS et al. (1992), medindo as diferenças de potenciais elétricos de membrana ( $\Delta\Psi$ ) na faixa de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $20 \text{mmol L}^{-1}$  de concentração externa de nitrato, constataram que a absorção desse nutriente causou despolarização do  $\Delta\Psi$  em raízes de cevada. Segundo os autores, a despolarização observada na faixa do sistema de alta concentração ( $>1 \text{mmol L}^{-1}$ ), especialmente em plantas que não receberam pré-tratamento com nitrato, demonstra que a absorção pelo sistema de alta concentração (LATS) não ocorre por fluxo difusivo. Além disso, para ocorrer fluxo passivo, com o potencial de Nernst de -200 a -300 mV, e nas concentrações externas estudadas, a concentração citoplasmática deveria estar na faixa nanomolar, possibilidade improvável, considerando-se dados de literatura (KING et al., 1992).



GLASS et al. (1992) constataram, na faixa do sistema HATS, uma despolarização resultante da absorção de nitrato, seguida de uma repolarização. Em cevada, a despolarização é dependente da concentração desse nutriente e é saturável, de maneira similar à sua absorção. Nessa espécie, a despolarização, na faixa do sistema HATS, aumentou rapidamente após o período de 5 horas de exposição ao nitrato, correspondendo ao período de indução do influxo. As propriedades elétricas observadas confirmam características como dependência de concentração, indutibilidade e efeito *feedback* observados em experimentos de influxo de nitrato. Ainda segundo os mesmos autores, os fluxos de  $H^+$ , associados à absorção do nutriente, tanto pelo sistema HATS quanto pelo LATS, sugerem que um simporte do tipo  $2H^+ : 1NO_3^-$  pode ser a força determinante do transporte contra o gradiente de potencial eletroquímico.

Em resposta ao suprimento de nitrato para milho, McCLURE et al. (1990a) observaram que a resposta elétrica compôs-se de duas partes em seqüência: uma rápida e passageira despolarização do potencial de membrana, seguida de uma hiperpolarização. McCLURE et al. (1990b), com o auxílio de inibidores metabólicos, propõem um modelo em que a absorção de nitrato esteja ligada à atividade de uma  $H^+$  - ATPase. A despolarização passageira seria, portanto, o resultado de um simporte  $H^+ : NO_3^-$ , estequiometricamente maior que 1. A hiperpolarização subsequente seria causada por uma estimulação da atividade bombeadora de prótons da  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática, em função de alterações no potencial de membrana ou na atividade de  $H^+$  no citoplasma.

Evidências levaram à hipótese de que a própria nitrato redutase seria, em parte, a proteína envolvida na absorção de nitrato (BUTZ e JACKSON, 1977). Porém, WARNER e HUFFAKER (1989) mostraram que mutantes de cevada deficientes nessa enzima mantinham a capacidade normal de absorver nitrato do meio. Isso sugere que a



nitrito redutase e a(s) enzima(s) responsável(is) pela absorção do nutriente são proteínas distintas.

Omata et al. (1989), citados por SECHLEY et al. (1992), identificaram uma proteína de 45 KDa presente em células de *Synechococcus* PC7942 (*Anacystis nodulans* R2), crescendo com nitrito, mas ausente na presença de amônio.

Coincidentemente, polipeptídeos entre 30 e 40 KDa, aparentemente, foram induzidos por nitrito em milho (DHUGGA et al., 1988). Segundo esses autores, esse fato poderia representar a síntese *de novo* de transportadores de nitrito localizados na membrana plasmática, a qual ocorreria durante o período de indução.

## **2.2. Absorção de Amônio**

Em comparação ao processo de absorção de nitrito, a absorção de amônio é, ainda hoje, pouco conhecida, persistindo dúvidas em pontos chave para a interpretação das alterações no influxo desse nutriente causadas por fatores externos às plantas.

Trabalhando em baixas concentrações externas de amônio, (< 1 mM) Becking et al. (1956), citados por GLASS e SIDDIQI (1995), foram os primeiros a caracterizar cineticamente, em plantas de milho, um sistema de transporte saturável e de alta afinidade através da membrana plasmática. Posteriormente, esse sistema foi observado em um grande número de espécies.

Resultados obtidos a partir das alterações do potencial de membrana durante o suprimento extracelular de amônio em células de algas fornecem evidências de um uniporte de  $\text{NH}_4^+$  para o interior, por meio de carregadores específicos (KLEINER, 1981). Higinbotham et al. (1964), citados por KLEINER (1981), detectaram, em aveia, decréscimo do  $\Delta\Psi$  quando era adicionado amônio. A partir de observações de alcalinização do pH intracelular, quando da exposição



a sais de amônio, KLEINER (1981) considera, ainda, a possibilidade de passagem de  $\text{NH}_3$  por fluxo difusivo através da membrana.

Com base em estudos sobre afinidade para amônio em *Lemna gibba*, ULLRICH et al. (1984) sugerem que esse íon é absorvido, principalmente, pela mediação de carregador; porém, em concentrações externas elevadas, deve-se ter um componente difusivo. A detecção de acentuada despolarização do potencial de membrana (70 mV) em resposta à adição de amônio mostra que este é absorvido como cátion, e não na forma neutra. Considerando-se o potencial previsto pela equação de Nernst, o transporte de amônio pode dar-se por via passiva, sendo que seria requerida energia apenas em condições de baixa concentração externa do cátion.

Em plantas de arroz submetidas a redução de temperatura, observou-se menor absorção de nitrato e de amônio, sendo a última menos sensível aos tratamentos (SASAKAWA e YAMAMOTO, 1978). Segundo os autores, a relação entre transporte de íons e temperatura (quantificada pelos valores de  $Q_{10}$ ) é consequência da atividade metabólica necessária para o transporte. Inibidores metabólicos como cicloheximida, KCN ou arsenato inibiram quase completamente a absorção de nitrato, ao passo que produziram efeitos bem menos acentuados na absorção de amônio.

WANG et al. (1993b) forneceram a primeira caracterização detalhada do influxo de  $\text{NH}_4^+$  através da plasmalema de raízes de arroz. O influxo de amônio é bifásico e mediado por dois sistemas discretos de transporte. Na faixa de baixa concentração externa de amônio (< 1 mM), o influxo caracteriza-se como cinética do tipo Michaelis-Menten, sendo considerado sistema de alta afinidade (HATS). Na faixa de alta concentração (1 a 40 mM), a relação entre concentração externa de amônio e influxo foi linear. Os fluxos, nessas elevadas concentrações externas, são resultado das atividades combinadas do sistema HATS e do sistema de baixa afinidade (LATS). Inibidores metabólicos ligados à cadeia de transporte de elétrons



reduziram o influxo de amônio através do sistema HATS de 81 a 87%, enquanto provocaram redução de influxo devido ao sistema LATS de 31 a 51%. Essas observações, juntamente com os dados de  $Q_{10}$  obtidos, indicam que ambos os sistemas são dependentes de energia metabólica, embora o sistema HATS tenha mostrado, claramente, maior sensibilidade aos tratamentos de caráter metabólico do que o sistema LATS. Sugere-se cautela na interpretação dos efeitos ligados a inibidores, pois outros processos metabólicos também dependentes de energia, como a assimilação, podem ser afetados, mascarando os efeitos atribuídos à absorção.

Embora o autor tenha considerado bastante improvável o transporte ativo pelo sistema LATS, é importante saber qual concentração externa de amônio é o divisor entre os dois sistemas de absorção, ainda que não haja, necessariamente, uma separação clara. Pode-se pressupor que, quanto maior a participação do sistema de transporte passivo com relação ao ativo, maior será a estabilidade do influxo de amônio em plantas submetidas a fatores potencialmente causadores de distúrbios metabólicos.

Os efeitos da aplicação de inibidores metabólicos, tanto sob os potenciais elétricos desenvolvidos pela absorção de amônio (WANG et al., 1994) quanto sob o influxo desse íon (WANG et al., 1993b) fornecem evidências para a consideração de dependência (direta ou indireta) com relação à força motriz de prótons. Os dois sistemas (HATS e LATS) devem ter diferentes mecanismos de acoplamento energético, mostrando-se o sistema LATS menos eletrogênico que o sistema HATS (WANG et al., 1994). A absorção passiva pelo sistema LATS poderia ocorrer por meio de um uniporte eletrogênico (KLEINER, 1981; ULLRICH et al., 1984). A observação de um canal iônico para potássio, que apresenta características compatíveis com a entrada de  $NH_4^+$  (Schachtman et al., 1992, citados por WANG et al., 1994), sugere que o transporte de baixa afinidade de amônio ocorreria por meio



desses canais. Quanto ao sistema de alta afinidade, mecanismos como um simporte próton: $\text{NH}_4^+$  ou ATPase específica são propostos.

Plantas de trigo e aveia, previamente submetidas a período de seis dias omissão de nitrogênio, apresentaram substancial aumento na capacidade de influxo de amônio, em comparação às plantas mantidas sob suprimento contínuo de nitrato (MORGAN e JACKSON, 1988). Em resposta a período de exposição de 5 - 10 horas ao nutriente, houve um aumento de 25 a 35% do influxo de amônio. Portanto, em plantas previamente submetidas à omissão de nitrogênio, é aparentemente necessário um período finito de indução para a ocorrência posterior da estimulação da absorção. Uma possível particularidade do sistema de absorção de amônio com relação ao de nitrato diz respeito à indutibilidade. Enquanto a absorção de nitrato decai poucas horas após a retirada do nutriente do meio externo (SIDDIQI et al., 1989), o sistema de absorção de amônio é aparentemente estimulado por período de privação de nitrogênio de seis dias (MORGAN e JACKSON, 1988), embora haja estímulo adicional do influxo quando da reexposição a amônio (indução). Mesmo considerando-se as diferenças metodológicas entre os experimentos, é possível que o sistema de absorção de amônio seja menos sensível ao fator indutibilidade do que o sistema de absorção de nitrato. Observa-se que os dados para amônio são bem mais escassos do que para nitrato, não permitindo uma análise conclusiva da questão.

O influxo de amônio pelo sistema HATS está sujeito a inibição por *feedback* negativo (WANG et al., 1993b). Com o aumento da concentração do íon na solução, a concentração radicular de amônio aumenta e o influxo decresce. Nesse caso, de modo peculiar, a inibição afeta tanto valores de  $V_{\text{máx}}$  (diminuem) quanto de  $K_m$  (aumentam). Os sinais promotores da inibição *feedback* podem ser amônio não metabolizado ou compostos de nitrogênio reduzidos



(segundo MORGAN e JACKSON, 1988; produtos de assimilação de amônio).

### **2.3. Redução do Nitrato e Assimilação do Amônio**

Dependendo da concentração externa de nitrato, esse pode ser armazenado na raiz, transferido para as folhas e armazenado no vacúolo, ou ser reduzido nas raízes ou folhas (SECHLEY et al., 1992).

O nitrato, uma vez absorvido, será reduzido a nitrito pela redutase do nitrato (NR), localizada no citossol das células do mesófilo em milho (VAUGHN e CAMPBELL, 1988). SHANER e BOYER (1976ab) mostraram que a atividade dessa enzima dependeu do nitrato transportado para as folhas, preferencialmente aos níveis do nutriente já existentes no órgão. Essa observação deve-se à existência de *pools* internos ativos, que respondem diretamente ao suprimento externo de nitrato e a *pools* de armazenamento que devem estar localizados no vacúolo.

O nitrito será reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela redutase do nitrito (NiR) nos cloroplastos ou plastídeos de raiz (SECHLEY et al., 1992). Segue-se a incorporação em esqueletos carbônicos pelas enzimas de assimilação de amônio.

A enzima desidrogenase do glutamato (GDH) catalisa uma rota alternativa para a assimilação de amônio, a aaminação redutiva do 2-oxoglutarato; ou a desaminação oxidativa do glutamato (SECHLEY et al., 1992). Esta rota alternativa, sabe-se hoje, é responsável somente por pequena (desprezível) fração do total de amônio assimilado em tecidos de plantas superiores (MIFLIN e LEA, 1980).

A sintetase da glutamina (GS) catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato, amônio e ATP. Atuando junto com a sintase do glutamato (GOGAT), que catalisa a reação de transferência do grupo nitrogênio-amídico da glutamina para o 2-oxoglutarato produzindo duas moléculas de glutamato (JOY, 1988), forma o ciclo GS/GOGAT.

Esse é considerado a principal via de assimilação de amônio na maioria dos tecidos de plantas (MIFLIN e LEA, 1980).

A glutamina pode ser substrato para a síntese de outros aminoácidos como a asparagina, enquanto o glutamato participa de várias reações de transaminação (JOY, 1988). A glutamina pode também ser diretamente utilizada na síntese de proteínas (SECHLEY et al., 1992).

É hoje amplamente aceito que a assimilação do nitrogênio na maioria das plantas superiores se dá principalmente pela via GS/GOGAT, e a GS é descrita como sendo, no arroz, a enzima primária do metabolismo do amônio (ARIMA e KUMAZAWA, 1977; RHODES et al., 1980; LEWIS et al., 1983; RHODES et al., 1986).

Dados obtidos com espécies sensíveis ou tolerantes à toxicidade de  $\text{NH}_4^+$  (parte aérea) sugerem ser a GS uma enzima chave para a detoxificação dessa forma de nitrogênio em tecidos verdes (MAGALHÃES e HUBER, 1989).

#### **2.4. Suprimento de Nitrato x Amônio**

Constatando uma velocidade de penetração de amônia que excedeu em 157% à de nitrato em plantas de milho, IVANKO e INGVERSEN (1971) observaram, como reação, uma intensa assimilação da amônia absorvida, atingindo, após 6 horas, 168% com relação ao tratamento com nitrato. Por sua vez, parece que uma grande parte do nitrato absorvido pode ser acumulado no espaço interno das células da raiz e transportado para as parte superiores em crescimento sem mudanças químicas específicas.

MAGALHÃES et al. (1992), observando marcação de aminoácidos com  $^{15}\text{N}$  mais acentuada nas raízes de plantas de milho do que na parte aérea, consideram consistente que a assimilação de amônio exógeno ocorra primeiramente nas raízes, sendo o  $^{15}\text{N}$  da parte



aérea derivado dos aminoácidos formados nas raízes e subsequentemente transportados.

As amidas, com suas baixas relações C:N, são as principais transportadoras de nitrogênio orgânico no xilema de milho. Em plantas supridas exclusivamente com nitrato, o maior suprimento de nitrogênio das raízes para a parte aérea está na forma de nitrato (59%) com somente 35% transportados como compostos aminados, principalmente glutamina. Nessas condições, o principal sítio de assimilação de nitrogênio é a parte aérea. Em plantas supridas com amônio, 84% do nitrogênio exportado das raízes para a parte aérea estão na forma de compostos orgânicos, predominando asparagina e glutamina, sendo o restante translocado como amônio (não tóxico em baixas concentrações). Portanto, em condições de suprimento exclusivo com amônio, as raízes são o principal sítio de assimilação de nitrogênio. Em plantas supridas com amônio + nitrato (1:1), a maior parte do nitrogênio (64%) é exportada das raízes para a parte aérea na forma de compostos aminados, predominando glutamina, ascendendo somente 34% como nitrato. Nessas condições, as raízes são, novamente, o principal sítio de assimilação de nitrogênio, provavelmente em razão da mais rápida absorção de amônio com relação à de nitrato (MURPHY e LEWIS, 1987).

Em milho, a assimilação de amônio na parte aérea pode ser uma importante fonte de nitrogênio para abastecimento das raízes (GOJON et al., 1986). Desse modo, é possível a ocorrência de uma acentuada ciclagem de compostos de nitrogênio reduzidos nessas plantas. Assim sendo, os autores propõem que plântulas de cevada e de milho sejam capazes de modular as duas entradas no "pool de ciclagem de nitrogênio" (redução na raiz e na parte aérea) em função da magnitude relativa das duas saídas (síntese de proteína na raiz e na parte aérea), levando a um relativo balanço entre transporte ascendente e descendente.



Recentemente, técnicas sensíveis como a ressonância nuclear magnética vêm confirmando idéias já estabelecidas. Quando  $^{15}\text{NO}_3^-$  ou  $^{15}\text{NH}_4^+$  foram adicionados como fonte de nitrogênio para plantas de milho, o primeiro sinal de  $^{15}\text{N}$ -NMR detectado correspondeu à amida-glutamina. Desses resultados, inferiu-se a predominância da rota GS/GOGAT na assimilação do nitrogênio radicular (AMÂNCIO e SANTOS, 1992), bem como o papel das amidas (glutamina e asparagina) como compostos de reserva e também translocadores de nitrogênio orgânico.

Dados de BELTON et al. (1985) indicam a existência de um *pool* de nitrato vacuolar prontamente trocável. A distribuição intracelular de amônio, segundo os autores, não está clara, ainda que os dados sugiram certa compartimentação desse nutriente.

WANG et al. (1993a), utilizando técnica de análise compartimental de amônio em arroz, identificaram três compartimentos correspondendo, supostamente, à solução superficial às raízes, parede celular (ou espaço livre aparente) e citoplasma.

A análise de ressonância nuclear magnética em raízes de milho crescidas com nitrato de amônio (LEE e RATCLIFFE, 1991) possibilitou observar que o amônio citoplasmático era demasiadamente baixo para ser detectado. Porém, sob nutrição amoniacal, essa concentração subiu dez vezes quando a GS era inibida com MSO (metionina sulfoximina).

O amônio é um potente inibidor *feedback* do influxo de nitrato (KING et al., 1993). Com o incremento da concentração externa de amônio de  $0,005 \text{ mol m}^{-3}$  para  $50 \text{ mol m}^{-3}$ , o valor de  $V_{\text{máx}}$ , estimado por LEE e DREW (1989) para influxo de nitrato em cevada, tornou-se progressivamente menor, não havendo mudança sistemática de  $K_m$ . Observação similar em plantas de arroz, na presença simultânea de nitrato e amônio, foi feita por YOUNGDAHL et al. (1982). A alteração é rápida e reversível (LEE e DREW, 1989). O uso de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, durante o crescimento, causou uma

alteração nutricional mais persistente do que aquela causada por tratamentos mais breves com amônio. Uma das possíveis explicações se baseia na despolarização observada quando do influxo de amônio. Considerando-se o possível co-transporte nitrato/prótons, alterações na força motriz de prótons através da plasmalema seriam capazes de afetar as taxas de influxo de nitrato.

## **2.5. Deficiência de Fósforo x Absorção e Metabolismo de Nitrogênio**

Três efeitos distintos têm sido identificados quando plantas, crescendo na presença de nitrato, são privadas de fósforo. Primeiro, a absorção de nitrato pelas raízes decresce (LEE, 1982; SCHJØRRING, 1986; RUFTY Jr. et al., 1990; RUFTY Jr. et al., 1991). Segundo, a translocação de nitrato das raízes para a parte aérea diminui, aparentemente em virtude da restrição do transporte do simplasto da raiz para o xilema. Terceiro, o acúmulo de aminoácidos aumenta, o que geralmente se observa em folhas e raízes (RUFTY Jr. et al., 1993).

RUFTY Jr. et al. (1991) verificaram, em cevada, a redução do  $V_{máx}$  para nitrato com a omissão de fósforo, sendo que o influxo de nitrato para as células da raiz decresceu sensivelmente.

Em razão da restrição da translocação, houve, em plantas de fumo submetidas a períodos de omissão de fósforo, pronunciado acúmulo de nitrato nas raízes a partir do terceiro dia de estresse (RUFTY Jr. et al., 1990), sendo constatado o mesmo em soja (ISRAEL e RUFTY Jr., 1988).

Em plantas sob estresse de fósforo, foi observada redução na concentração de proteínas (BESFORD, 1979; RUFTY Jr. et al., 1990). A retenção de nitrato nas raízes foi o principal evento endógeno que limitou a eficiência de redução e incorporação em proteínas nas folhas (RUFTY Jr. et al., 1990).



O distúrbio no metabolismo de nitrogênio causado pela deficiência de fósforo caracteriza-se, em linhas gerais, pelo decréscimo na redução do nitrato (ANDREEVA et al., 1992b; RUFTY Jr. et al., 1990), pelo acúmulo de aminoácidos na parte aérea (ANDREEVA et al., 1992b; BESFORD, 1979) ou na parte aérea e raízes (RUFTY Jr. et al., 1990) e pelo acúmulo de compostos nitrogenados solúveis em todas as partes da planta (ISRAEL e RUFTY Jr., 1988). Podem também ocorrer menor síntese de proteínas (ANDREEVA et al., 1992b), estimulação da proteólise (KATO, 1977; ANDREEVA et al., 1992b) e degradação de aminoácidos (RABE e LOVATT, 1986).

Tem-se observado o acúmulo de arginina em plantas submetidas à deficiência de fósforo (RABE e LOVATT, 1984; RABE e LOVATT, 1986; RUFTY Jr. et al., 1993). A proteólise e a síntese *de novo* do aminoácido podem contribuir para esse acúmulo. Plantas de soja privadas de fósforo por 20 dias apresentaram acúmulo de arginina nas folhas e asparagina no caule e nas raízes (RUFTY Jr. et al., 1993).

CHERNYAVSKAYA e TUEVA (1975) observaram que o acúmulo de arginina em folhas de abóbora, sob deficiência de fósforo, ocorreu principalmente na fração de aminoácidos livres ou em estado de ligação lábil em estruturas da célula.

RABE e LOVATT (1986) constataram aumento significativo de atividade da rota de biossíntese *de novo* de arginina, em condições de deficiência de fósforo. O incremento foi uma resposta prévia à deficiência daquele nutriente, ocorrendo, em alguns casos, antes de sintomas visíveis de deficiência de fósforo. Houve acúmulo de amônia, que aumentou com o incremento do estresse de fósforo. Segundo o autor, o aumento da atividade biossintética *de novo* de arginina pode funcionar como mecanismo de detoxificação de amônia, quando em excesso no tecido foliar. A participação de outros caminhos na acumulação de arginina ficou evidente quando se observou que a



atividade da rota alternativa não foi suficiente para explicar as quantidades totais acumuladas do aminoácido.

A hipótese de que ocorra limitação na disponibilidade de ATP e de fósforo inorgânico (Pi) metabólico em plantas sob estresse de fósforo é reforçada pela acumulação de excesso de amido nas raízes. As duas moléculas são necessárias para a máxima atividade das rotas de degradação do carboidrato (RUFTY Jr. et al., 1993).

Poder-se-ia pensar, inicialmente, que o decréscimo de ATP fosse a causa fundamental da redução da absorção de nitrato em plantas sob estresse de fósforo. RUFTY Jr. et al. (1990) observaram que o crescimento radicular de fumo manteve-se semelhante ao do controle e o teor de carboidratos nas raízes manteve-se superior a esse, até o sexto dia de estresse de fósforo. Porém, na mesma época, ocorreu decréscimo acentuado na absorção de nitrato. Além disso, a restrição à absorção de nitrogênio precedeu decréscimos na incorporação de nitrogênio absorvido nas proteínas da raiz, processo também dependente de energia. Com isso, o autor questiona a teoria de limitação energética como causadora do decréscimo de absorção de nitrato, na primeira semana de omissão de fósforo. A restrição na disponibilidade de energia metabólica (ATP) poderia assumir maior importância após o sexto dia de omissão de fósforo. Segundo os autores, esses dados parecem indicar que o processo de inibição da absorção de nitrogênio está ligado a fatores regulatórios na formação ou atividade do sistema de transporte, na primeira semana de omissão de fósforo.

Em linhas gerais, a limitação da absorção de nitrato em plantas sob estresse de fósforo pode estar relacionada a efeitos regulatórios ou energéticos. No primeiro caso, considera-se o papel dos aminoácidos, ou mesmo o do próprio nitrato acumulado, como promotores de mecanismo de inibição do tipo *feedback* negativo na absorção de nitrogênio (SCHJØRRING, 1986). Nesse caso, compostos como asparagina e glutamina (RUFTY Jr. et al., 1990; LEE et al., 1992),

asparagina e nitrato (RUFTY Jr. et al., 1993), cisteína, glicina e serina (BRETELER e ARNOZIST, 1985) podem causar a inibição. A associação estreita entre o declínio na concentração radicular de fósforo e o influxo de nitrato indica um acoplamento regulatório. Assim, a síntese do sistema de transporte pode ser particularmente sensível a decréscimo de uma molécula como Pi (RUFTY Jr. et al., 1991). No segundo caso (hipótese energética), o decréscimo de ATP pode ser responsável por restrição na síntese do sistema de transporte de nitrogênio, ou a limitação de ATP pode restringir a energia disponível diretamente para o transporte de nitrato contra o gradiente de potencial eletroquímico (RUFTY Jr. et al., 1993).

RUFTY Jr. et al. (1993) consideram que, pelo menos inicialmente, a absorção de nitrato é regulada por fatores endógenos à raiz. As concentrações de algumas formas de fósforo como Pi, fósforo orgânico (Po) e ATP, apresentaram decréscimo já aos cinco dias de supressão de fósforo, continuando a decrescer com o tempo e com o declínio na absorção de nitrato. Essas alterações de concentração podem estar envolvidas na regulação da absorção de nitrato.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção do Material Vegetal**

Sementes do híbrido simples, progenitor masculino do híbrido duplo de milho (*Zea mays* L.) BR - 201, obtidas no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da EMBRAPA, foram postas para germinar em rolos de papel de germinação colocados em vasos contendo água desionizada, sob arejamento contínuo, em casa de vegetação. Após a emergência, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade e transplantadas para 8 bandejas de plástico em número de 30 plantas por bandeja, contendo 13 litros de solução nutritiva de Steinberg pH 5,5, modificada por FOY et al. (1967) (Quadro 1). A aeração foi mantida constante e a solução trocada a cada dois dias.



Quadro 1 - Fonte e Concentração dos Nutrientes da Solução Nutritiva de Steinberg, modificada por FOY et al. (1967)

Elemento	Fonte	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )	Elemento	Fonte	Concentração (μmol L <sup>-1</sup> )
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,29	B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,47
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		Zn	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9,79
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3,71	Fe	FeHDTA	71,62
	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O		Cu	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,16
	KNO <sub>3</sub>		Mn	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,37
P	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10	Mo	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05
K	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Cl	KCl	9,59
	KNO <sub>3</sub>	0,75			
	KCl				
Ca	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,27			
Mg	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,27			
S	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,12			

### 3.2. Cinéticas de Absorção de Nitrato e de Amônio

Sete dias após o transplante, o fósforo foi omitido em metade das bandejas. A partir daí, foram realizadas cinéticas de absorção de nitrato e de amônio em plantas submetidas e não - submetidas a períodos prévios de omissão de fósforo por dois, quatro, seis, oito e dez dias, na ausência e na presença de fósforo durante o período de cinética (5 cinéticas). Os tratamentos constituintes de cada cinética consistiram de um fatorial 2 x 2 (omissão de fósforo/não - omissão de fósforo em período prévio à cinética e presença/ausência de fósforo durante a cinética), em blocos casualizados, com quatro repetições.

Dois dias antes da execução de cada cinética, as plantas das bandejas foram selecionadas novamente quanto à uniformidade e transferidas, em número de duas por recipiente, para vasos plásticos de 1,5 litros de capacidade (cinéticas dos períodos dois, quatro e seis

dias) e 3,0 litros (cinéticas dos períodos oito e dez dias), contendo as mesmas soluções das bandejas.

No dia anterior à execução de cada cinética, os vasos foram transferidos para câmara de crescimento, submetendo-se as plantas a um fotoperíodo de 12 horas, temperatura diurna média de  $25,3^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , temperatura noturna média de  $19,6^{\circ}\text{C} \pm 0,9$ , umidade relativa diurna média de  $71,7\% \pm 2,3$  e irradiância de  $540 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Na manhã do dia em que se completou cada um dos 5 períodos prévios de omissão e não - omissão de fósforo, plantas submetidas e não - submetidas a dois, quatro, seis, oito e dez dias de omissão prévia de fósforo foram transferidas para solução de estabilização constituída de  $100 \mu\text{moles L}^{-1}$  de nitrato de amônio e  $50 \mu\text{moles L}^{-1}$  de cloreto de cálcio para todos os tratamentos. Os tratamentos referentes à presença de fósforo durante o período de cinética foram constituídos pela adição de  $100 \mu\text{moles L}^{-1}$  de fosfato monobásico de potássio. Para se obterem as condições de estado estacionário de absorção, requeridas para o estudo de cinética de absorção iônica (EPSTEIN e HAGEN, 1952), as plantas permaneceram 1 hora na solução de estabilização. Ao fim desse tempo, as plantas foram transferidas para a solução de cinética, idêntica à solução de estabilização, iniciando-se a retirada de alíquotas de 10 mL de cada vaso, a cada 30 minutos, durante 9 horas. Essas alíquotas foram congeladas imediatamente para dosagem posterior de nitrato e de amônio. Os vasos foram pesados antes do início e após o fim de cada cinética, para estimar a água perdida por evapotranspiração.

A dosagem de nitrato e de amônio na solução de cinética foi realizada por sistema de injeção em fluxo ("Flow Injection Analysis" - FIA). O método utilizado para a determinação de nitrato foi o descrito por KAMPHAKE et al. (1967) e para a determinação de amônio, o descrito por ALVES et al. (1993).

Os dados de diminuição da concentração de nitrato e de amônio na solução de cinética em consequência da absorção pelas plantas,



plotados em função do tempo de amostragem (curvas de exaustão), foram corrigidos para o conteúdo de cada forma de nitrogênio retirada por amostragem e para o volume da solução de absorção perdido por evapotranspiração e por amostragem.

### **3.3. Translocação de Nitrogênio**

Ao final de cada cinética, as plantas foram transferidas novamente para a solução inicial (referente ao tempo zero de amostragem). Após uma hora, foram cortadas com estilete 1 cm acima do colo e às 19 horas o exsudato do xilema foi recolhido com seringa hipodérmica durante 30 minutos. Estimou-se a quantidade de exsudato produzido pela diferença de peso entre o frasco sem a amostra e após o seu recolhimento, sendo as amostras imediatamente congeladas.

Em seguida à digestão sulfúrica (SILVA, 1981), foi determinado o conteúdo de nitrogênio orgânico no exsudato do xilema recolhido ao final das cinéticas referentes aos períodos prévios de omissão/não - omissão de fósforo por dois e quatro dias. A dosagem de nitrogênio foi feita colorimetricamente pelo sistema FIA, utilizando-se o método descrito por ZAGATTO et al. (1981). Determinou-se o conteúdo de nitrogênio total no exsudato do xilema recolhido ao término das demais cinéticas. O nitrato presente nas amostras foi reduzido a amônio (PRUDEN et al., 1985), após o que se procedeu à digestão sulfúrica. O  $N-NH_3$  foi destilado de uma alíquota da solução, na presença de hidróxido de sódio e recebido em solução de ácido bórico saturada (método Kjeldahl). O complexo formado foi titulado com solução padrão de  $H_2SO_4$   $0,006 \text{ mol L}^{-1}$  (SILVA, 1981). A eficiência do procedimento de redução foi acompanhada por meio de soluções padrão de nitrato de amônio, obtendo-se valores em torno de 96%.

Considerando-se cada cinética como experimento independente, os experimentos que na análise de variância apresentaram

homogeneidade de quadrado médio do resíduo foram analisados conjuntamente. Foram testadas as diferenças de médias de conteúdo de nitrogênio orgânico e nitrogênio total entre e dentro de período prévio de omissão/não - omissão de fósforo, utilizando-se o teste de Duncan a 1 e 5%.

#### **3.4. Análise do Tecido Vegetal**

Terminada a coleta do exsudato do xilema, as plantas foram colhidas e divididas em raiz e parte aérea, sendo as raízes lavadas e secas em papel-toalha. O material vegetal foi colocado para secar em estufa de circulação forçada a 70°C até atingir peso constante e, a seguir, pesado, moído e armazenado para análise química.

Após digestão sulfúrica do material vegetal, determinou-se a concentração de nitrogênio total pelo método do fenol/hipoclorito (ZAGATTO et al., 1981). O fósforo foi dosado por meio de espectrometria por emissão ótica de plasma, após mineralização do tecido por digestão nítrico-perclórica (MALAVOLTA et al., 1989).

A análise estatística foi feita de maneira semelhante ao descrito no item 3.3.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Produção de Matéria Seca, Teores de Fósforo Total e Nitrogênio Total na Parte Aérea e Raízes de Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva.**

Houve tendência de redução na produção de matéria seca da parte aérea a partir de quatro dias de omissão prévia de fósforo, tornando-se significativa e tendo-se acentuado a diferença com o aumento do período de omissão prévia do nutriente (Quadro 2).

Não se verificou diferença significativa na produção de matéria seca de raiz em função dos tratamentos (Quadro 3). A literatura relata redução da relação parte aérea/raiz em resposta ao estresse de fósforo (ALVES, 1994). A redução de crescimento da parte aérea antes que a raiz seja afetada pode estar relacionada, dentre outros fatores, à atuação das raízes como dreno preferencial de carboidratos (CLARKSON, 1985) e à redistribuição interna de fósforo. Esses aspectos foram discutidos por ALVES (1994).

Quadro 2 - Acúmulo de matéria seca, concentração de fósforo e de nitrogênio total na parte aérea das plantas de milho nos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética) e -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética)

Tratamentos	Períodos prévios à cinética (dias)				
	2	4	6	8	10
Matéria Seca da Parte Aérea					
----- g/vaso -----					
+P+P	1,37 A	2,01 B	3,05 A	4,14 A	5,87 A
+P-P	1,34 A	2,35 A	3,26 A	4,27 A	5,92 A
-P+P	1,37 A	1,91 B	2,37 B	2,40 B	2,70 B
-P-P	1,40 A	1,86 B	2,28 B	2,47 B	2,69 B
Fósforo na Parte Aérea					
----- mg P/100 mg matéria seca -----					
+P+P	0,60 Aa	0,51 Ab	0,50 Ab	0,46 Ac	0,43 Ad
+P-P	0,55 Ba	0,45 Bbc	0,47 Bb	0,44 Ac	0,38 Bd
-P+P	0,40 Ca	0,29 Cb	0,25 Cc	0,22 Bd	0,20 Cd
-P-P	0,28 Da	0,18 Db	0,13 Dc	0,11 Cc	0,08 Dd
Nitrogênio da Parte Aérea					
----- mg N/100 mg matéria seca -----					
+P+P	3,50 Aa	3,53 Aa	3,14 Ab	3,19 Ab	3,06 Bb
+P-P	3,58 Aa	3,54 Aa	3,16 Ab	3,19 Ab	3,27 Ab
-P+P	3,25 Ba	3,02 Cb	2,99 Ab	2,76 Bc	2,72 Cc
-P-P	3,24 Ba	3,23 Ba	3,02 Ab	2,77 Bc	2,97 Bb

Médias de matéria seca seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade.

Médias de concentração de nitrogênio e fósforo seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas ou minúscula nas linhas não diferem pelo teste Duncan a 5 % de probabilidade.



Quadro 3 - Acúmulo de matéria seca, concentração de fósforo e de nitrogênio total nas raízes das plantas de milho nos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética) e -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética)

Tratamentos	Períodos prévios à cinética (dias)				
	2	4	6	8	10
Matéria Seca de Raiz					
	----- g/vaso -----				
+P+P	0,41 A	0,55 A	0,72 A	0,80 A	1,12 A
+P-P	0,43 A	0,68 A	0,75 A	0,85 A	1,14 A
-P+P	0,44 A	0,63 A	0,77 A	0,83 A	1,07 A
-P-P	0,46 A	0,64 A	0,78 A	0,91 A	1,24 A
Fósforo na Raiz					
	----- mg P/100 mg matéria seca -----				
+P+P	0,49 Aa	0,49 Aa	0,46 Aa	0,46 Aa	0,39 Ab
+P-P	0,40 Ba	0,40 Ba	0,37 Bab	0,35 Bbc	0,31 Bc
-P+P	0,35 Ca	0,30 Cb	0,27 Cb	0,27 Cb	0,28 Bb
-P-P	0,21 Da	0,16 Db	0,12 Dbc	0,09 Dcd	0,07 Cd
Nitrogênio na Raiz					
	----- mg N/100 mg matéria seca -----				
+P+P	3,33 Aab	3,40 Aab	3,33 Bab	3,15 Ab	3,47 Aa
+P-P	3,40 Aa	3,46 Aa	3,69 Aa	3,03 Ab	3,55 Aa
-P+P	3,27 Aa	3,07 Ba	2,97 Ca	2,36 Cb	2,43 Bb
-P-P	3,13 Aa	2,87 Bab	2,77 Cb	2,65 Bb	2,62 Bb

Médias de matéria seca seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Duncan a 1 % de probabilidade.

Médias de concentração de fósforo e nitrogênio seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas ou minúscula nas linhas não diferem pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

Aumento da relação raiz/parte aérea sob condição de estresse de fósforo poderia ser conseqüência da rápida síntese de Po pelas raízes em compostos necessários ao crescimento, o que resultaria na falta de Pi disponível para transporte para a parte aérea (CHAPIN e BIELESKI, 1982). Tal fato foi observado em plantas de milho e discutido em detalhes por ALVES (1994).



Período de dois dias de omissão de fósforo reduziu a concentração desse elemento na parte aérea (Quadro 2). O ressuprimento de fósforo durante a cinética aumentou a sua concentração com relação ao não - ressuprimento. Esse efeito persistiu em todos os períodos de omissão de fósforo, sendo a magnitude desse aumento em função do tratamento, semelhante entre os períodos. Entretanto, 9 horas de ressuprimento não foi tempo suficiente para a recuperação total da concentração de fósforo, nem mesmo no menor período de omissão prévia (dois dias). A ausência de fósforo durante a cinética, em plantas não - submetidas à sua omissão prévia, provocou redução significativa de concentração em todos os períodos, exceto no período de oito dias.

Nas raízes de plantas não - submetidas à omissão prévia de fósforo, a ausência do nutriente durante a cinética provocou redução significativa de sua concentração (Quadro 3). A omissão prévia de fósforo reduziu acentuadamente a concentração do nutriente nas raízes (~50%) já aos dois dias de omissão, de maneira semelhante ao ocorrido na parte aérea. Novamente, o ressuprimento de fósforo durante a cinética em plantas submetidas à sua omissão prévia promoveu aumento de concentração desse nutriente (Quadro 3).

A omissão prévia de fósforo na solução nutritiva reduziu as concentrações de nitrogênio total na parte aérea das plantas em todos os períodos (Quadro 2).

O período de dois dias de omissão prévia de fósforo não provocou redução significativa na concentração de nitrogênio total nas raízes, havendo redução significativa em todos os demais períodos (Quadro 3). A ausência de redução significativa da concentração de nitrogênio total nas raízes no período de dois dias e a significância detectada na parte aérea, no mesmo período, pode refletir translocação de nitrogênio da parte aérea para as raízes, tamponando a queda de concentração radicular, conseqüente da menor absorção de nitrogênio



causada pela omissão prévia de fósforo. A retenção do nitrato absorvido nas raízes pode também estar envolvida.

#### **4.2. Absorção de Nitrato por Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva**

Omissão de fósforo na solução nutritiva, por dois dias, reduziu em cerca de 63% o nitrato absorvido por grama de matéria seca de raiz, avaliado na última amostragem (540 minutos), com relação ao controle (Figura 1). Com o aumento do período de omissão de fósforo, observou-se decréscimo progressivo na absorção de nitrato (Figuras 1, 2 e 3). Períodos de omissão de fósforo superiores a seis dias paralizaram completamente a absorção de nitrato.

A menor absorção de nitrato em plantas submetidas à omissão de fósforo, reflexo da diminuição na taxa de absorção do nutriente, resultou em redução na quantidade de nitrato absorvida por grama de matéria seca ao final de 540 minutos de cinética, desde dois dias de omissão prévia de fósforo.

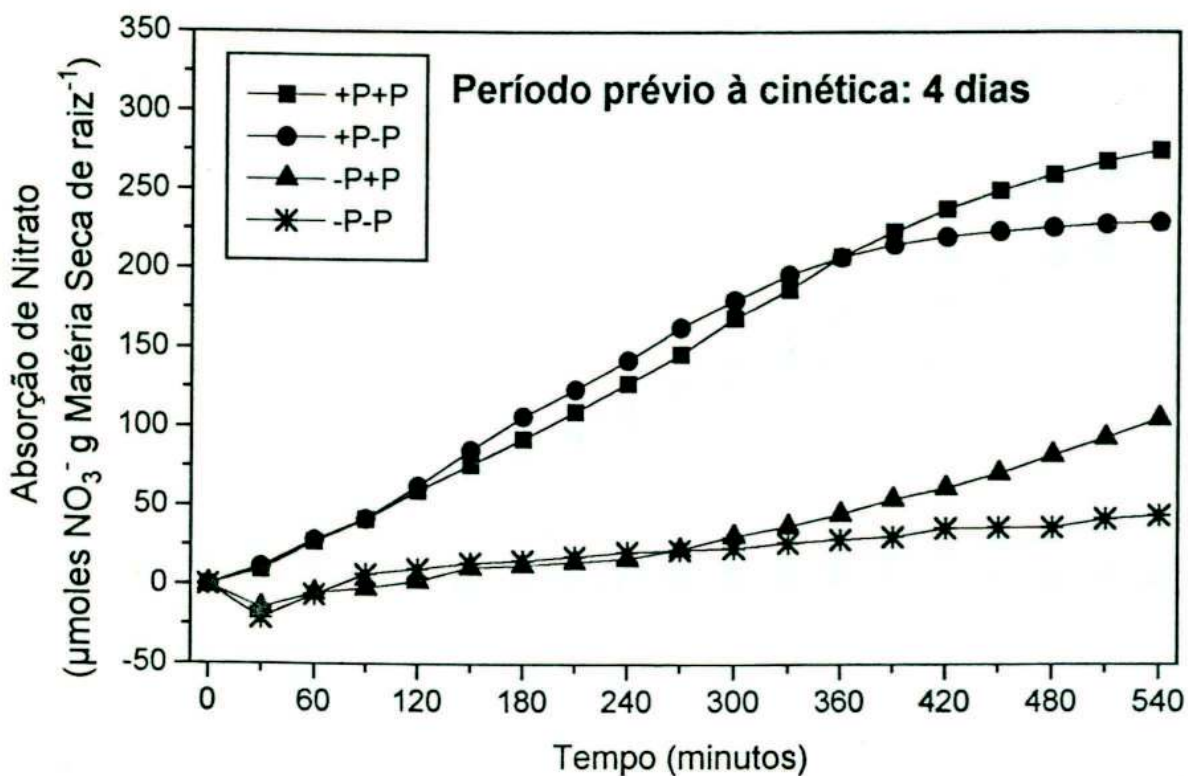
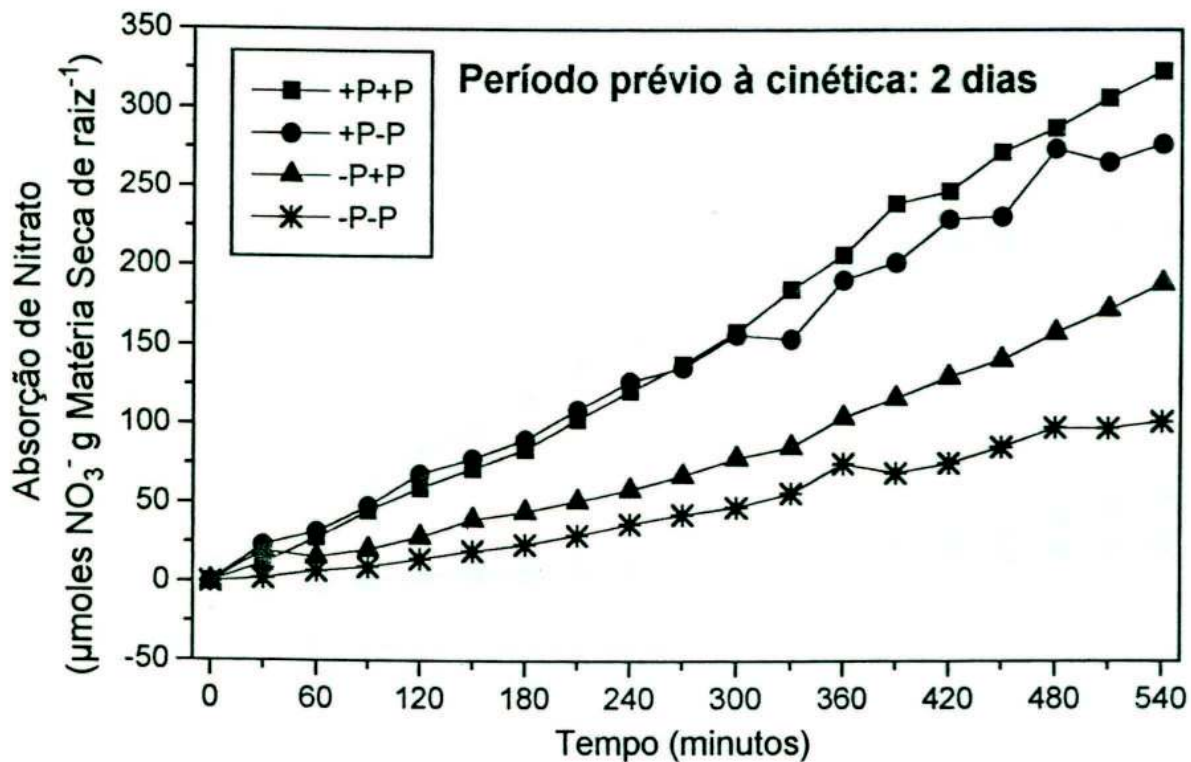


Figura 1-Absorção de nitrato por plantas de milho dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética), -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética) - nos períodos prévios à cinética de 2 e 4 dias.



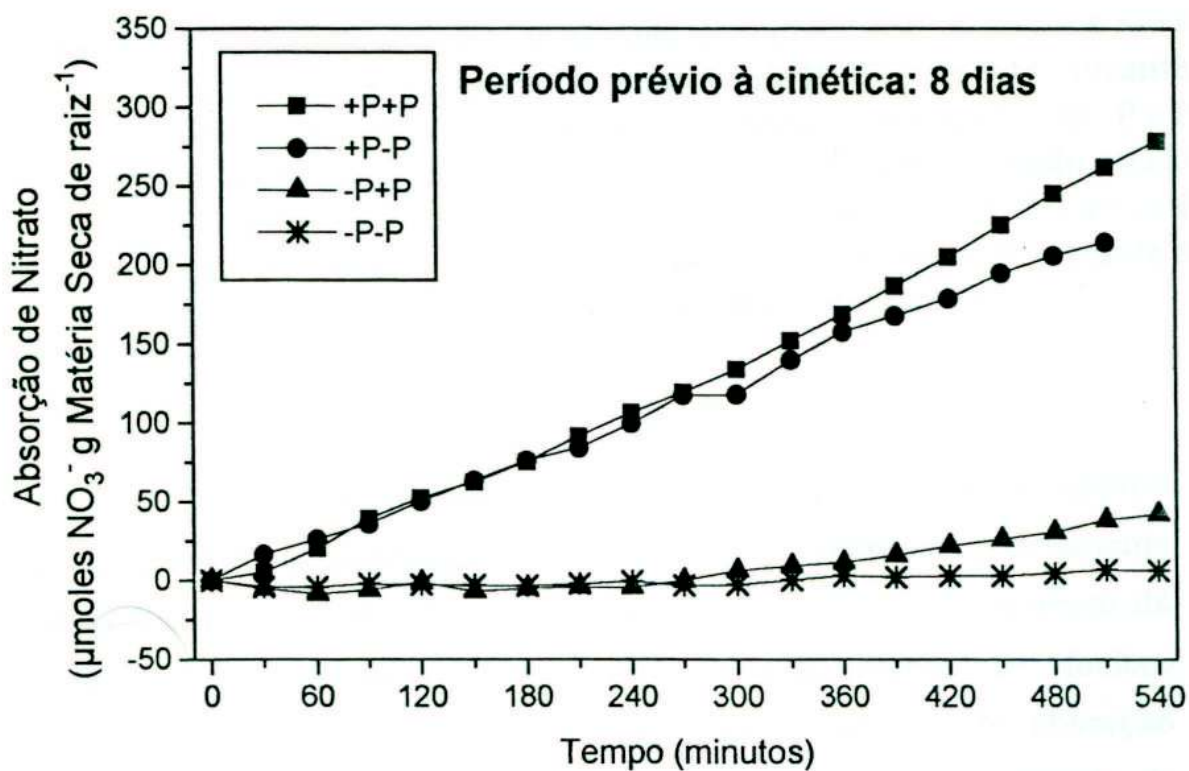
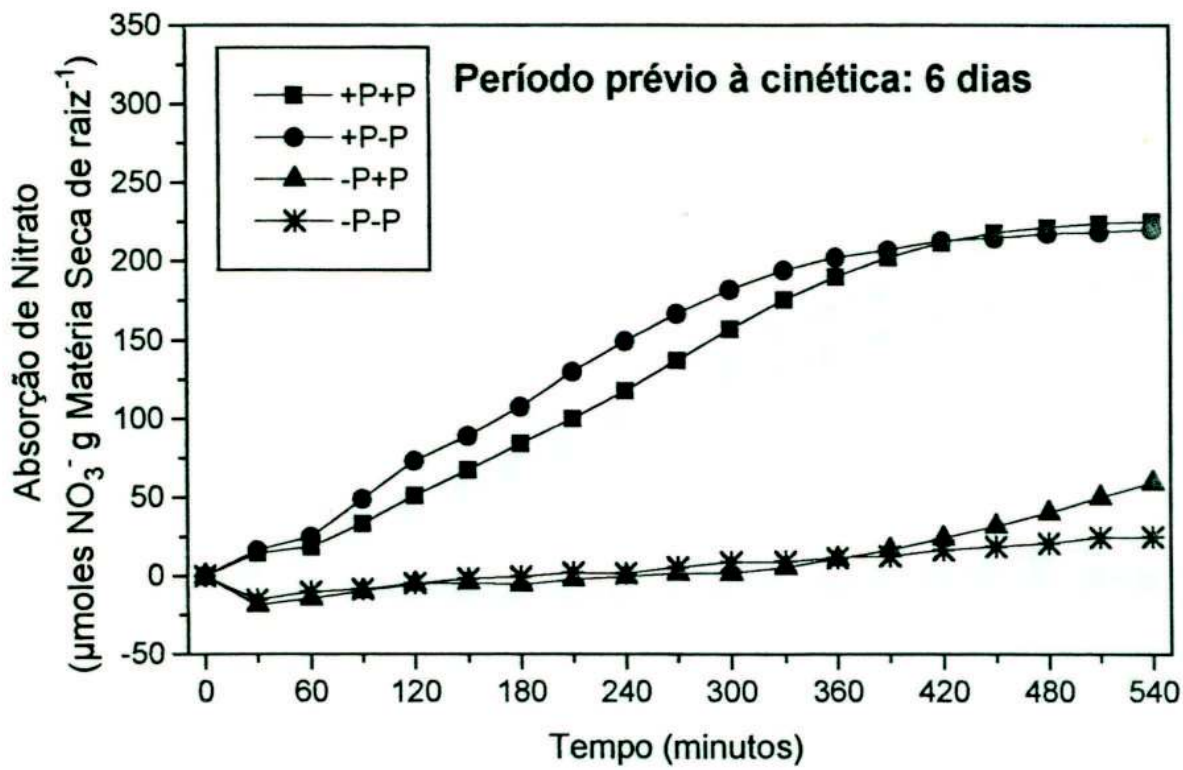


Figura 2-Absorção de nitrato por plantas de milho dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética), -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética) - nos períodos prévios à cinética de 6 e 8 dias.

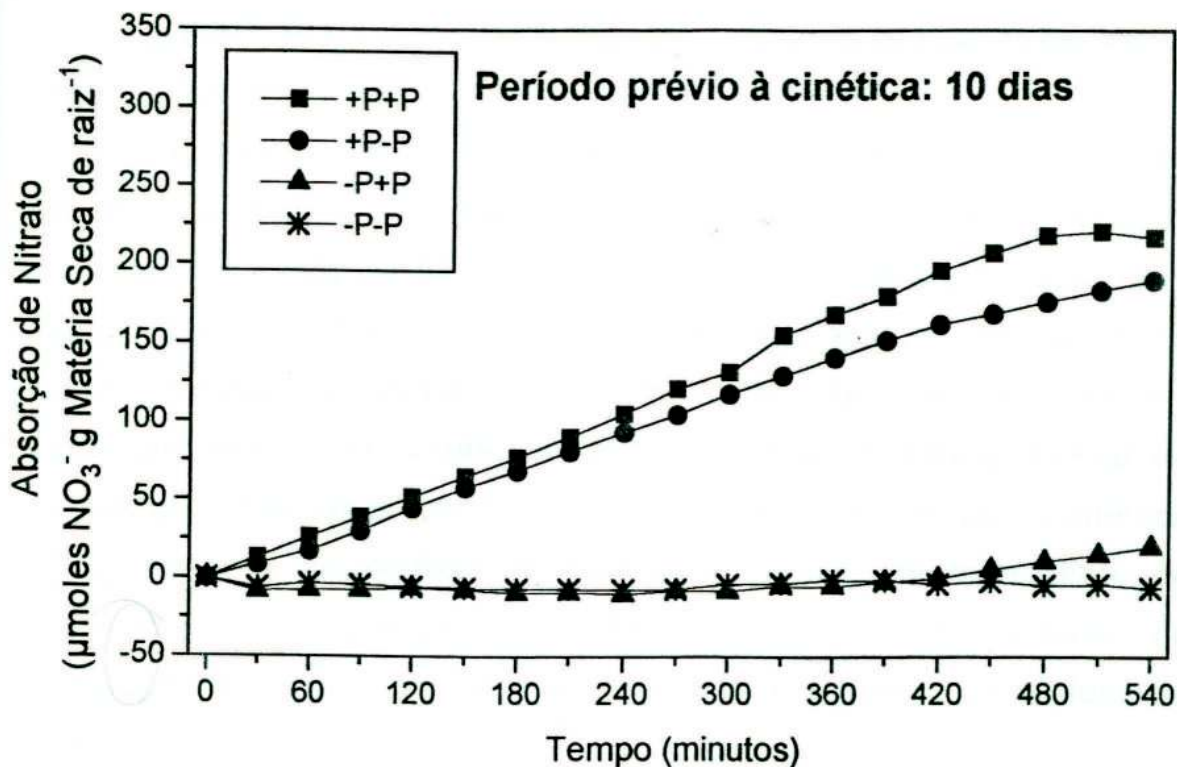


Figura 3-Absorção de nitrato por plantas de milho dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética), -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética) - no período prévio à cinética de 10 dias.

O ressuprimento de fósforo durante a cinética recuperou parcialmente a absorção de nitrato em plantas previamente submetidas a períodos de omissão daquele nutriente. O aumento da absorção de nitrato em função do ressuprimento de fósforo correspondeu à tendência de reversão do decréscimo de absorção causado pela omissão prévia de fósforo (Figura 1). Com o aumento do período de omissão de fósforo, observou-se aumento do tempo necessário para detecção do efeito reversivo, bem como redução na magnitude da ativação (Figuras 1, 2 e 3). Mesmo em plantas submetidas a 10 dias de omissão de fósforo (Figura 3), em que a



absorção de nitrato já estava paralizada, verificou-se esse efeito, ainda que ligeiramente.

O efeito reversivo, observado simultaneamente à aplicação do fósforo no período dois dias, passou a depender, aparentemente, de uma determinada fração de tempo para produzir absorção detectável nos demais períodos. Portanto, nos períodos de quatro, seis, oito e dez dias puderam-se notar duas fases de absorção quando do ressuprimento, em plantas sob omissão prévia de fósforo. Apesar de essas duas fases já se encontrarem distintas desde o início da cinética (30 minutos), no período de dois dias, houve um incremento de absorção mais pronunciado, com cerca de 330 minutos de ressuprimento. Esse tempo aumentou com o aumento do período de omissão de fósforo.

Não seria de se esperar que o ressuprimento de fósforo, ativando a absorção de nitrato (Figuras 1, 2 e 3), alterasse acentuadamente os teores de nitrogênio total das plantas. Apesar da absorção de quantidades consideráveis de nitrogênio em função do ressuprimento de fósforo, principalmente nos períodos iniciais de omissão, a análise dos teores totais de nitrogênio (Quadros 2 e 3) não foi suficientemente sensível para expressar a absorção em período relativamente curto (9 horas). A redução dos teores de nitrogênio total em plantas submetidas à omissão prévia de fósforo é devida à diminuição de absorção de nitrogênio.

Menores taxas de absorção de nitrato são relatadas em colza, cevada e trigo-mouro (SCHJØRRING, 1986), tabaco (RUFTY Jr. et al., 1990) e cevada (LEE, 1982, RUFTY Jr. et al., 1991), em condições de deficiência de fósforo. O decréscimo de absorção de nitrato causado pela deficiência de fósforo foi similar para as três espécies estudadas por SCHØRRING (1986), tanto quando nitrato era a única fonte de nitrogênio quanto na presença de nitrato e de amônio.

A faixa de concentração externa de nitrogênio utilizada nesse experimento ( $100 \mu\text{moles L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$ ) está dentro da faixa de atividade



do sistema de absorção de alta afinidade, dependente de energia metabólica (GLASS et al., 1990). Portanto, distúrbios no metabolismo energético celular em função da omissão de fósforo são fatores que poderiam explicar a redução na absorção de nitrato.

RUFTY Jr. et al. (1990) observaram elevadas concentrações de carboidratos (sacarose, hexoses e amido) nas raízes de plantas de fumo sob estresse de fósforo até o sexto dia de omissão do nutriente, seguindo-se quedas. Manutenção significativa da fotossíntese em condições de deficiência de Pi (dez dias sem fósforo) foi observada em plantas de mostarda (ANDREEVA et al., 1992ab). Segundo esses autores, a manutenção da taxa fotossintética, durante o período de estresse, seria uma importante resposta adaptativa, suprindo a planta com energia durante esse período. Porém foram observadas distorções na partição de carbono, resultando em acúmulo de amido.

Entretanto, apesar de as taxas de fotossíntese terem-se mantido relativamente altas em cana-de-açúcar e em soja sob deficiência de fósforo, curtos períodos de privação de fósforo resultaram em baixos níveis foliares de compostos adenilados (RAO et al., 1993). Portanto, apesar da possível menor sensibilidade da fotossíntese a períodos iniciais de estresse de fósforo, os níveis de ATP não devem seguir, necessariamente a mesma tendência, provavelmente por estarem envolvidos outros mecanismos regulatórios. Contudo, a manutenção de níveis elevados de carboidratos em condições de estresse de fósforo pode sugerir que a recuperação dos níveis de ATP ocorra com rapidez em razão da disponibilidade de substrato para respiração, mediante o retorno do fósforo ao meio.

Em plantas de soja, um período de dois dias de omissão de fósforo provocou redução de cerca de 15% nos níveis de ATP (RUFTY Jr. et al., 1993). Considerando-se a estreita relação entre concentração de ATP no tecido radicular e influxo de nitrato observada pelos autores em soja, a redução de 63% do nitrato absorvido em função de dois



dias de omissão de fósforo (Figura 1) pode ser atribuída à baixa disponibilidade de energia metabólica.

Em células de fitoplâncton submetidas à omissão de fósforo, a concentração de ATP aumentou de 5,6% para 7,4% com duas horas de adição desse nutriente (WATANABE et al., 1987). Segundo os autores, a adição de fósforo a células deficientes nesse nutriente causa rápido e acentuado aumento no conteúdo de ATP. Rápida recuperação dos níveis de ATP poderia explicar a recuperação da absorção de nitrato observada com o ressuprimento de fósforo (Figuras 1, 2 e 3).

Considerando os níveis de carboidratos ainda elevados geralmente encontrados em plantas sob períodos iniciais de estresse de fósforo, RUFTY Jr. et al. (1993) sugerem que a queda constatada dos níveis de ATP seja devida a ajustes na respiração (hipótese condizente com os dados de ANDREEVA et al., 1992ab).

Em plantas de feijão, crescidas em meio deficiente de fósforo, houve um rápido decréscimo no nível de Pi total nas raízes. A taxa de respiração total não foi afetada pela deficiência, porém grande parte foi resultado da contribuição (paralelamente ao decréscimo de Pi nas raízes) da rota alternativa, não fosforilativa, respiração resistente ao cianeto (RYCHTER e MIKULSKA, 1990). Uma grande participação dessa rota em plantas de feijão sob deficiência de fósforo, acompanhada de redução da atividade da rota do citocromo, levou à diminuição de 60% da produção de ATP pela mitocôndria com relação ao controle. Um incremento do nível de Pi total, observado após 3,5 horas de incubação dessas plantas em meio com fósforo, inibiu acentuadamente a taxa de respiração pela rota alternativa. O efeito reversivo do fósforo ressuprido durante a cinética (Figuras 1, 2 e 3), que também resultou em aumento significativo da concentração de fósforo total radicular (Quadro 3), pode ter sido conseqüência de uma maior disponibilidade de ATP em função da elevação do *pool* citoplasmático de fósforo. Nesse caso, o fósforo citoplasmático exerceria efeito regulatório sob a produção de ATP, aumentando a



participação da rota do citocromo. De fato, alterações na cadeia respiratória podem ocorrer em função das condições metabólicas do citossol (RYCHTER et al., 1992). Segundo a autora, desde que, devido à participação da rota alternativa, se tenha, como conseqüência, uma diminuição do *pool* de ATP, processos que dependam de energia, como por exemplo absorção de nitrato, podem ter sua atividade reduzida.

Sob condição de estresse de Pi, paralelamente a um decréscimo acentuado nos níveis de ADP, ATP e Pi, houve indução de enzimas responsáveis pelo *bypass* das reações glicolíticas dependentes dessas três moléculas, em células de *Brassica nigra* (DUFF et al., 1989). Em células de *Selenastrum minutum*, crescidas sob deficiência de Pi, observou-se redução dos compostos adenilados, sendo que os níveis de ATP foram 30% menores com relação ao controle (THEODOROU et al., 1991). Segundo os autores, a manutenção seletiva da proteína ATP:Fru-6-P 1-phosphotransferase, em detrimento ao declínio significativo da concentração de proteína solúvel, pode representar parte de uma estratégia de manutenção do sistema respiratório celular durante o estresse de Pi. Dessa maneira, amido acumulado sob deficiência de fósforo (QIU e ISRAEL, 1992) poderia ser rapidamente mobilizado quando da reentrada em ambiente rico em Pi. Resta saber se esses vários mecanismos respiratórios alternativos que ocorrem em condições de estresse de fósforo podem estar atuando em plantas de milho e, ainda, se sua velocidade seria suficiente para explicar a reversão causada pelo fósforo ressuprido durante a cinética sob a absorção de nitrato (Figuras 1, 2 e 3).

Os resultados de LI e ASHIHARA (1990) indicam que o aumento dos níveis de compostos fosforilados e enzimas relacionadas, induzidos por Pi, podem contribuir para a estimulação do catabolismo de açúcares em *Catharanthus roseus*. Assim, um decréscimo dessa atividade catabólica poderia ser responsável pelo decréscimo de ATP e pela conseqüente diminuição na absorção de nitrato. Os resultados de USUDA e SHIMOGAWARA (1991), que indicaram que baixa



concentração de Pi em cloroplastos de plantas C<sub>4</sub> inibiu a degradação de amido em milho, reforçam essa hipótese visto ser a absorção de nitrato dependente da energia relacionada ao *pool* de carboidratos (RUFTY Jr. et al., 1989).

RUFTY Jr. et al. (1990) consideram a possibilidade de que efeitos regulatórios específicos sejam exercidos na formação ou atividade do sistema de transporte de nitrato, na primeira semana de estresse de fósforo. Dada a característica indutibilidade desse sistema (SIDDIQI et al., 1989), baixo influxo de nitrato levaria a baixas concentrações citoplasmáticas do nutriente, ocorrendo “desindução” do sistema de transporte de nitrato. O modelo de absorção de nitrato para plantas de milho é descrito por JACKSON et al. (1973) como apresentando uma baixa taxa inicial, que aumenta constantemente até uma taxa máxima com 3-4 horas. Esse tempo, aparentemente necessário para a plena indutibilidade do sistema de absorção, coincide, aproximadamente, com o tempo necessário para a expressão do efeito reversivo do fósforo adicionado durante a cinética (Figuras 1, 2 e 3). Pode-se sugerir que o efeito interno de fósforo, seja sob o prisma energético, ou mesmo regulatório, se expresse por meio da indução do sistema de transporte de nitrato, antes reprimido. Como observado nas Figuras 1 a 3 e Quadro 3, RUFTY Jr. et al. (1991) também constataram queda de influxo de nitrato associada à privação de fósforo e à queda da concentração radicular do nutriente. Esses resultados sugerem efeito regulatório de fósforo, sendo que a própria síntese do sistema de transporte de nitrato pode ser particularmente sensível a decréscimo de ATP ou mesmo à molécula de Pi. Mais especificamente a síntese *de novo* de proteínas, da qual a indução do sistema de alta capacidade de transporte de nitrato é dependente (BEHL et al, 1988) pode ter sido inibida pela deficiência de fósforo.

#### **4.3. Absorção de Amônio por Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva**

A omissão de fósforo na solução nutritiva reduziu a absorção de amônio desde dois dias de omissão, em função de menores taxas de absorção do nutriente (Figura 4). De maneira semelhante, VONA et al. (1992) observaram, em condições de deficiência externa de fósforo, redução de 59 % na taxa de absorção de amônio em alga.

Entretanto, a absorção de amônio mostrou-se notadamente menos sensível à omissão de fósforo na solução nutritiva do que a absorção de nitrato. O efeito da redução de absorção de amônio acentuou-se com o incremento do período de omissão de fósforo (Figuras 4, 5 e 6) , sendo que, com dez dias de omissão desse nutriente, a quantidade de amônio absorvido por grama de matéria seca de raiz, avaliada ao final da cinética (540 minutos), sofreu uma redução de cerca de 50% com relação ao controle. A absorção de nitrato, já aos dois dias de omissão de fósforo, havia sofrido redução maior (63%) do que aquela sofrida pela absorção de amônio no período mais avançado de omissão (dez dias), evidenciando a maior sensibilidade da primeira com relação à omissão de fósforo na solução nutritiva.



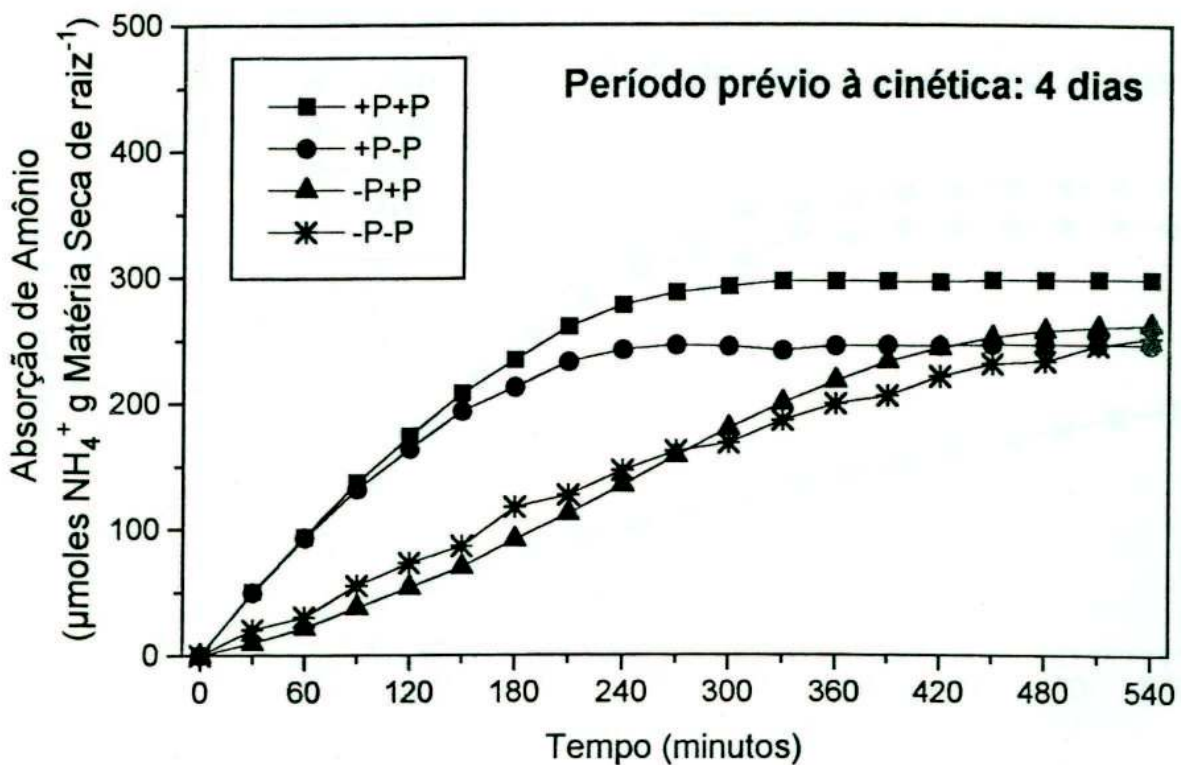
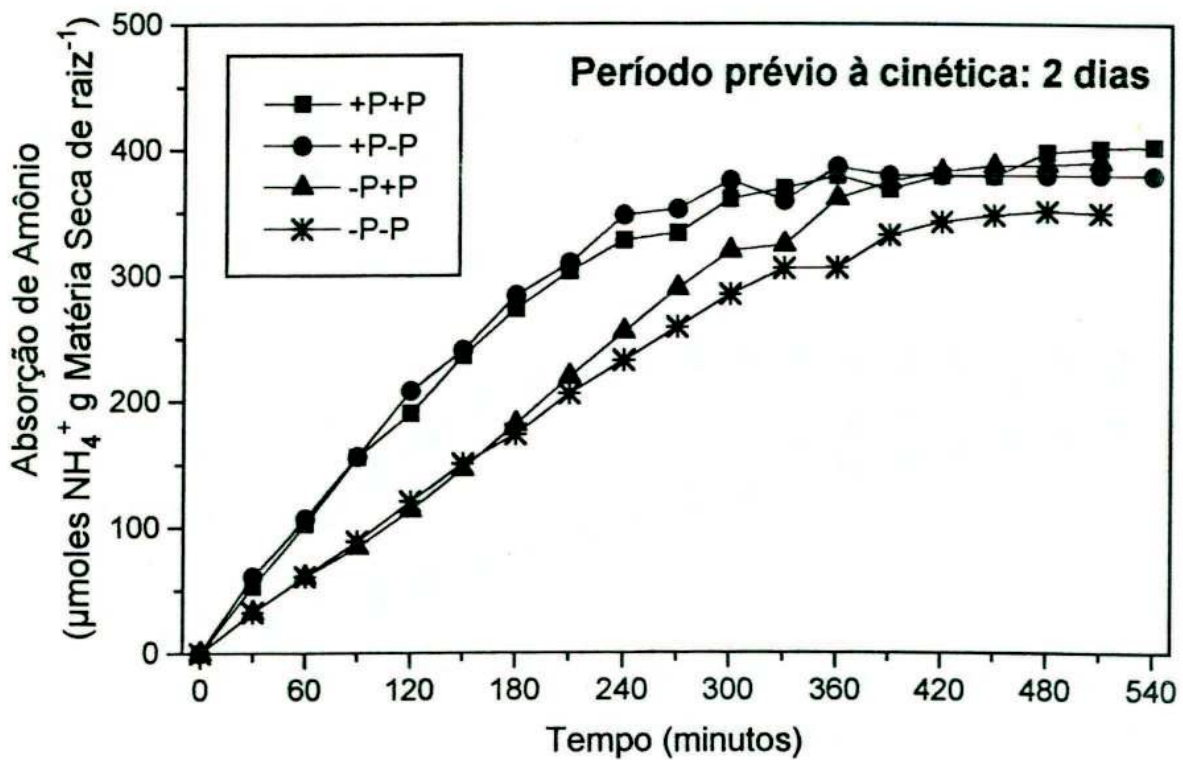


Figura 4-Absorção de amônio por plantas de milho dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética), -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética) - nos períodos prévios à cinética de 2 e 4 dias.

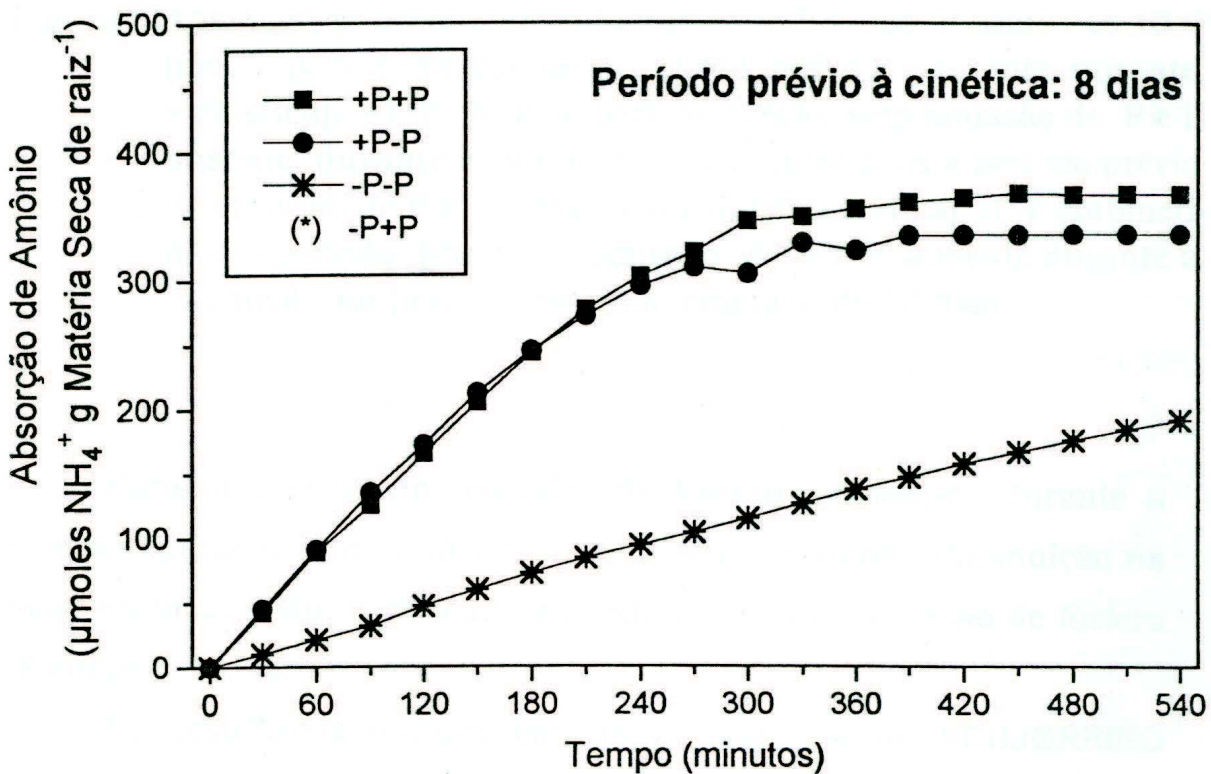
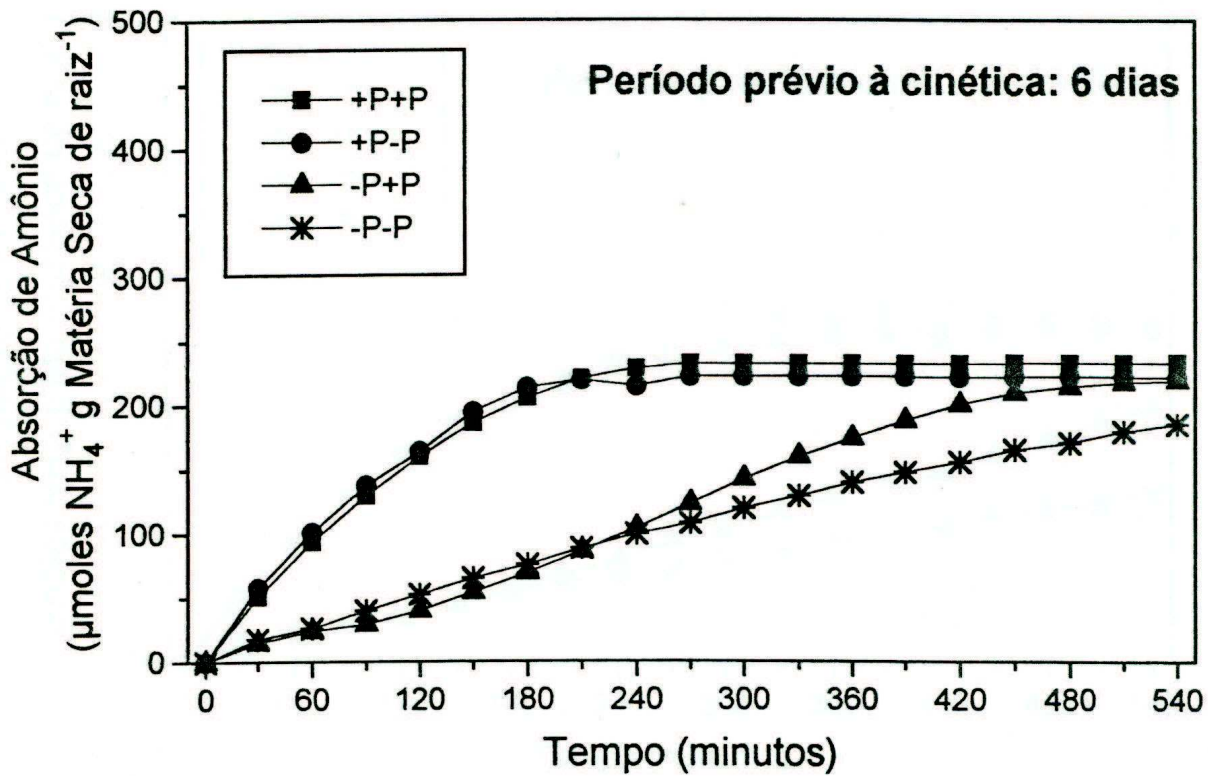


Figura 5-Absorção de amônio por plantas de milho dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética), -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética)- períodos prévios à cinética 6 e 8 dias. (\*) -P+P perdida.



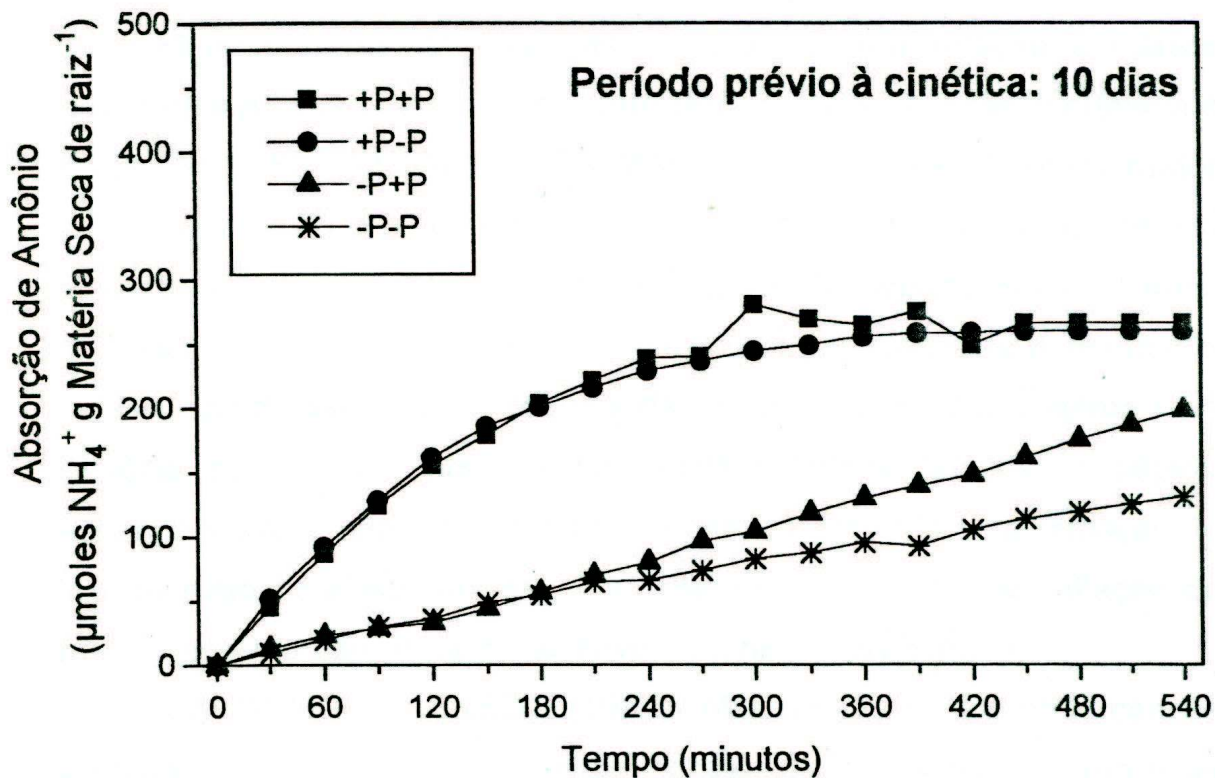


Figura 6-Absorção de amônio por plantas de milho dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética), -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética) - no período prévio à cinética de 10 dias.

Constatou-se efeito reversivo de fósforo adicionado durante a cinética também sobre a absorção de amônio, havendo diminuição na magnitude do efeito com o aumento do período de omissão de fósforo (Figuras 4, 5 e 6).

Os resultados obtidos concordam com os de SCHJØRRING (1986) que constatou ter sido a absorção de amônio menos afetada pela deficiência de fósforo do que a absorção de nitrato em trigo-mouro, cevada e colza. O autor destaca a importância do suprimento de amônio, principalmente quando sob suprimento insuficiente de fósforo.

Maiores taxas de absorção de amônio com relação a nitrato foram observadas neste experimento (Figuras 1 a 6). Essa tendência é típica (GLASS e SIDDIQI, 1995; MACKLON et al., 1990), sendo maior a diferença quando os dois íons estão presentes, simultaneamente, em soluções equimolares (MACKLON et al., 1990). Segundos os autores, as bases para essa preferência devem estar relacionadas à regulação pelas taxas de assimilação relativa das duas formas de nitrogênio e na história nutricional das plantas, dentre outros fatores. A rápida assimilação de amônio nas raízes, resultando em contínua remoção do íon do meio de absorção, em contraste com a menor assimilação de nitrato nesse órgão, pode estar envolvida nessa preferência.

MACDUFF e JACKSON (1991), observando maior absorção de amônio em relação à absorção de nitrato, em todas as temperaturas radiculares testadas em cevada, sugerem que a absorção de amônio pode ser energeticamente preferível. O efeito inibitório do amônio sob a absorção de nitrato (YOUNGDAHL et al., 1982; KING et al., 1993) também pode estar envolvido na preferência pela absorção de amônio.

Em termos energéticos, a absorção e assimilação de amônio deve ser menos dispendiosa do que a de nitrato, considerando-se que os valores de  $Q_{10}$  para absorção de nitrato são significativamente mais altos do que os de amônio (GLASS e SIDDIQI, 1995).

Enquanto a absorção de nitrato parece ser francamente ativa na faixa de concentração externa de  $100 \mu\text{moles L}^{-1}$  (GLASS et al., 1990; McCLURE et al., 1990b), para amônio, somente abaixo de  $40 \mu\text{M}$  seria necessário considerar-se a absorção ativa em plantas de arroz (Wang et al., 1994, citados por GLASS e SIDDIQI, 1995). ULLRICH et al. (1984), em *Lemna*, chegaram a conclusões semelhantes, determinando a concentração limite de  $67 \mu\text{M}$ . A concentração de  $42 \mu\text{M}$ , estimada pela energia livre necessária para o transporte de amônio através da plasmalema, utilizando-se a diferença entre o potencial de Nernst e o potencial de membrana medido, representa o limite acima do qual o transporte poderia ocorrer por via passiva em plantas em *steady-state*



(WANG et al., 1994). Os autores observaram que, submetendo-se as plantas a meio de crescimento com 2 ou 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , a concentração limite prevista para a separação dos dois transportes foi elevada de 42  $\mu\text{M}$  para 655  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Isso se deve à despolarização adicional e ao incremento da concentração citoplasmática de amônio. Acima dessas concentrações, o transporte poderia ocorrer por via passiva. WANG et al (1993b) observam que estimativas de energia livre fornecem somente uma predição da possibilidade de ocorrência do processo de absorção sob as condições esperadas, sugerindo cautela na identificação do tipo de transporte, baseando-se somente em considerações cinéticas ou termodinâmicas.

Segundo MACKLON et al. (1990), trabalhando com alho, embora as taxas de absorção de amônio sejam freqüentemente altas, a acumulação passiva pareceu possível, dada a rápida assimilação que manteve o gradiente eletroquímico para entrada do íon por difusão.

A menor sensibilidade do sistema de absorção de amônio a períodos de omissão de fósforo (Figuras 4, 5 e 6) com relação à absorção de nitrato (Figuras 1, 2 e 3) pode ter sido conseqüência da participação de transporte passivo de amônio, conferindo maior estabilidade à absorção, dada a menor dependência de energia metabólica. Lewis et al. (1986), citados por JOHNSON (1990), consideram que a absorção de amônio seja em parte ativa e em parte passiva, podendo haver contribuição em partes iguais de cada processo, quando removida a fonte respiratória.

Ainda que não seja possível, com os dados deste experimento, fornecer observações mais conclusivas, pode-se destacar, desde já, a importância da assimilação de amônio, tendo lugar principalmente nas raízes, no controle do *pool* citoplasmático do íon e, provavelmente, definindo a natureza do transporte predominante. O amônio parece reunir uma combinação pouco favorável à determinação das concentrações citoplasmáticas, um baixo *pool* citoplasmático e fluxos acentuados através das membranas (LEE e AYLING, 1993). Sob



nutrição com nitrato de amônio, o *pool* citoplasmático desse nutriente foi muito baixo para ser detectado por LEE e RATCLIFFE (1991) em raízes de milho, o que condiz com a alta eficiência do nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. O autor observou que a assimilação de amônio nas raízes foi igual à absorção através da plasmalema, adicionada de alguma fonte de geração interna. Conseqüentemente, o *steady-state* estabelecido em regiões maduras dessas raízes irá depender de como se comportam esses processos e também o fluxo de amônio para os vacúolos, em função das concentrações citoplasmáticas desse nutriente. Reforçando ainda a importância da assimilação nesse contexto, o autor observa que o amônio não é removido dos vacúolos rápido o bastante para suprir a demanda assimilatória e que somente a assimilação contínua previne a acumulação do íon capaz de atingir níveis elevados nas células do citoplasma da raiz. Esse autor ainda considera clara a existência de um excesso da atividade total da GS nas raízes com relação às taxas de absorção de amônio observadas no experimento.

Sob condição de estresse de fósforo, considerando-se a importância do processo assimilatório na regulação da absorção de amônio, torna-se interessante o monitoramento das fontes internas de geração desse nutriente como atividade da glutamato desidrogenase, aminoácido-oxidase, ou asparaginase (JOY, 1988). Processos descritos em ocasiões de estresse de fósforo como a síntese *de novo* de aminoácidos (RABE e LOVATT, 1984; RABE e LOVATT, 1986) poderiam, dependendo da intensidade do estresse, contribuir para a rápida assimilação do amônio absorvido. Essa rápida metabolização poderia manter o gradiente de potencial eletroquímico ao longo do qual haveria entrada passiva de amônio, resultando em maior estabilidade de absorção frente à redução dos níveis intracelulares de ATP. O balanço entre geração interna e assimilação desse nutriente, em diferentes níveis de estresse de fósforo, pode estar relacionado ao grau de sensibilidade da absorção de amônio a esse estresse.



Mesmo se desconsiderando a ocorrência de transporte parcialmente passivo de amônio, hipótese, pelo visto, aceitável, a menor sensibilidade do sistema de absorção desse nutriente em comparação ao de nitrato, a períodos de omissão de fósforo na solução nutritiva, poderia ser explicada pelo menor custo energético da absorção ativa do primeiro.

MENGEL e VIRO (1978), estudando a importância do status energético (frutose, glucose e sacarose) de plantas de arroz com relação à absorção e à incorporação de nitrogênio na forma de amônio, observaram que a absorção de nitrato foi mais dependente de energia do que a absorção de amônio. Os autores consideram previsível que a absorção e o metabolismo de nitrato sejam mais afetados em condições de baixa energia do que a absorção e o metabolismo de amônio, já que nitrato precisa de energia adicional para absorção ativa e redução do nitrato e nitrito. Ademais, MAGALHÃES et al. (1995), observando maiores concentrações de aminoácidos em tecidos sob nutrição amoniacal do que sob nutrição nítrica, sugerem, como possível explicação para a toxidez observada, a formação de um dreno de carboidratos em tecidos radiculares, levando outros tecidos à privação energética.

A assimilação de amônio, tendo como principal sítio as raízes (MURPHY e LEWIS, 1987), pode ser energeticamente vantajosa em condições de limitação de fósforo. Nessas condições, tornando-se as raízes drenos mais fortes para carboidratos do que a parte aérea (CLARKSON, 1985), pode-se esperar maior disponibilidade de energia diretamente no principal sítio para assimilação de amônio. Considerando o transporte de parte do nitrato absorvido, para posterior redução e assimilação na parte aérea, o “dreno radicular” poderia ser um fator energeticamente desvantajoso para nitrato. Portanto, amônio (MAGALHÃES et al., 1995) e limitação de fósforo (CLARKSON, 1985) podem estimular a formação do “dreno radicular”, favorecendo o metabolismo de amônio com relação a nitrato em



condições de omissão de fósforo. A manutenção do acúmulo de matéria seca radicular frente à redução na parte aérea, em função da omissão de fósforo na solução nutritiva (Quadros 2 e 3), indica que, realmente, pode ter havido maior disponibilidade de energia naqueles tecidos.

O custo energético para síntese de aminoácidos domina o custo para a síntese de proteínas quando nitrato é suprido, enquanto que esse custo é desprezível quando amônio é suprido (JOHNSON, 1990). Considerando que a síntese de aminoácidos (redução do nitrato) e a absorção de íons representam os maiores componentes da respiração radicular de manutenção, os resultados desse autor sugerem menor custo energético do metabolismo de amônio em relação a nitrato.

BLOOM et al. (1992), trabalhando com cevada, estimaram custos energéticos ligados à nutrição nítrica e amoniacal. Em condições de nutrição amoniacal, 14% do carbono radicular catabolizado são dirigidos para a absorção e assimilação de amônio. Sob nutrição nítrica, 5% do carbono radicular catabolizado são dirigidos à absorção de nitrato, 15% para assimilação de nitrato (redução a amônio) e 3% para assimilação de amônio. Portanto, 23% do carbono radicular catabolizado são gastos na aquisição de nitrogênio sob nutrição nítrica e 14% gastos sob nutrição amoniacal. Segundo o autor, a energia adicional requerida para assimilação de nitrato suporta a argumentação de que o crescimento pode ser mais limitado energeticamente sob nutrição nítrica do que sob nutrição amoniacal.

Portanto, a omissão de fósforo causando redução do *pool* energético disponível para absorção de íons deve ser mais severa sob a absorção de nitrato do que sob a absorção de amônio. Isso explicaria a menor sensibilidade da absorção de amônio à omissão de fósforo em comparação à absorção de nitrato (Figuras 1 a 6).

Essa sensibilidade, bem como o efeito reversivo de fósforo sob a absorção de amônio (Figuras 4, 5 e 6), pode estar relacionada a efeitos



regulatórios. Quando da adição de fósforo a células de algas anteriormente sob sua limitação, VONA et al. (1992) observaram decréscimo pronunciado de glutamato e aumento acentuado de alanina em 30 minutos, sugerindo que o tratamento tenha estimulado a transaminação entre glutamato e piruvato. A velocidade das alterações é compatível com o efeito reversivo de fósforo sob a absorção de amônio.

Papel de importância da glutamina foi sugerido quando raízes intactas de milho ou cevada foram expostas a MSO (inibidor da GS) na presença de amônio por 6 horas. O influxo subsequente de amônio marcado aumentou mais de 4 vezes em milho e mais de 8 vezes em cevada (LEE e AYLING, 1993). O autor considera esse fenômeno e o aumento da absorção de amônio após período de privação de nitrogênio manifestações do mesmo sistema regulatório: mudança nos níveis de certos compostos nitrogenados orgânicos estreitamente associados à assimilação de nitrogênio nas raízes, e, em particular, possível redução na concentração citossólica de glutamina. O mecanismo de ação do MSO poderia estar também relacionado a um aumento do *pool* citoplasmático de amônio.

Características do sistema de absorção de nitrato, que o tornariam mais sensível à indutibilidade, em comparação com o sistema de absorção de amônio, poderiam auxiliar na explicação da maior estabilidade do segundo frente à omissão de fósforo observada neste experimento (Figuras 4, 5 e 6). LEE et al. (1992) observaram taxas de influxo de amônio duas vezes maiores quando plantas de milho eram submetidas a período de 12 horas sem nitrogênio externo. Segundo o autor, no caso da absorção de nitrato, a resposta à omissão de nitrogênio é complicada pela necessidade de indução do transporte após período de ausência de nitrato (SIDDIQI et al., 1989). Apesar de a literatura fornecer indícios desse comportamento, ainda não se podem colocar conclusões, principalmente dada a ausência de informações mais completas para amônio.



GOYAL e HUFFAKER (1986) sugerem a necessidade de período de 5 horas de indução para o transporte de amônio. Considerando que o fósforo ressuprido durante a cinética provocou efeito reversivo (Figuras 4, 5 e 6), não se pode descartar que a indutibilidade seja um fenômeno de importância no comportamento observado. Porém, mesmo necessitando possivelmente de indução, o sistema de transporte de amônio parece ser menos dependente do que o de nitrato, resultando, em função disso, maior estabilidade. A possibilidade de fluxo parcialmente passivo de amônio nas concentrações utilizadas neste experimento pode caracterizar uma forma de manutenção do estado induzido frente aos fatores causadores de deficiência de energia metabólica.

#### **4.4. Produção de Exsudato do Xilema e Conteúdo de Nitrogênio Total Translocado em Plantas de Milho Submetidas a Períodos Crescentes de Omissão de Fósforo na Solução Nutritiva.**

A produção de exsudato do xilema por plantas submetidas a todos os períodos prévios de omissão de fósforo e não - ressupridas com esse nutriente durante a cinética sofreu redução significativa com relação aos demais tratamentos (Figura 7). Até quatro dias de período prévio de omissão de fósforo, o ressuprimento desse nutriente durante a cinética foi capaz de restaurar totalmente a produção de exsudato do xilema. Desse modo, não houve diferenças significativas entre plantas submetidas e não - submetidas a período prévio de omissão de fósforo, quando ambas foram supridas com o nutriente durante a cinética. Em plantas não - submetidas a período prévio de omissão de fósforo, houve redução significativa na produção de exsudato na ausência desse nutriente suprido durante a cinética em todos os períodos. Isso evidencia a importância da presença de fósforo ao longo do período de absorção, na manutenção da característica em estudo.



Até quatro dias de omissão prévia, plantas supridas com fósforo durante a cinética produziram mais exsudato do que plantas não - supridas, mesmo quando essas não tinham sido submetidas à omissão prévia de fósforo. Portanto, a presença de fósforo durante o período de absorção não só reverteu o efeito da omissão prévia desse nutriente como foi necessária para manutenção de taxas normais de exsudação. Intervalo de 9 horas na ausência de fósforo foi suficiente para causar acentuados distúrbios na produção de exsudato do xilema.

A partir de seis dias de omissão prévia de fósforo, o seu ressuprimento, embora provocando acentuada reversão do efeito de omissão prévia, não produziu recuperação total da produção de exsudato com relação ao controle sem omissão prévia e sob suprimento de fósforo durante a cinética.

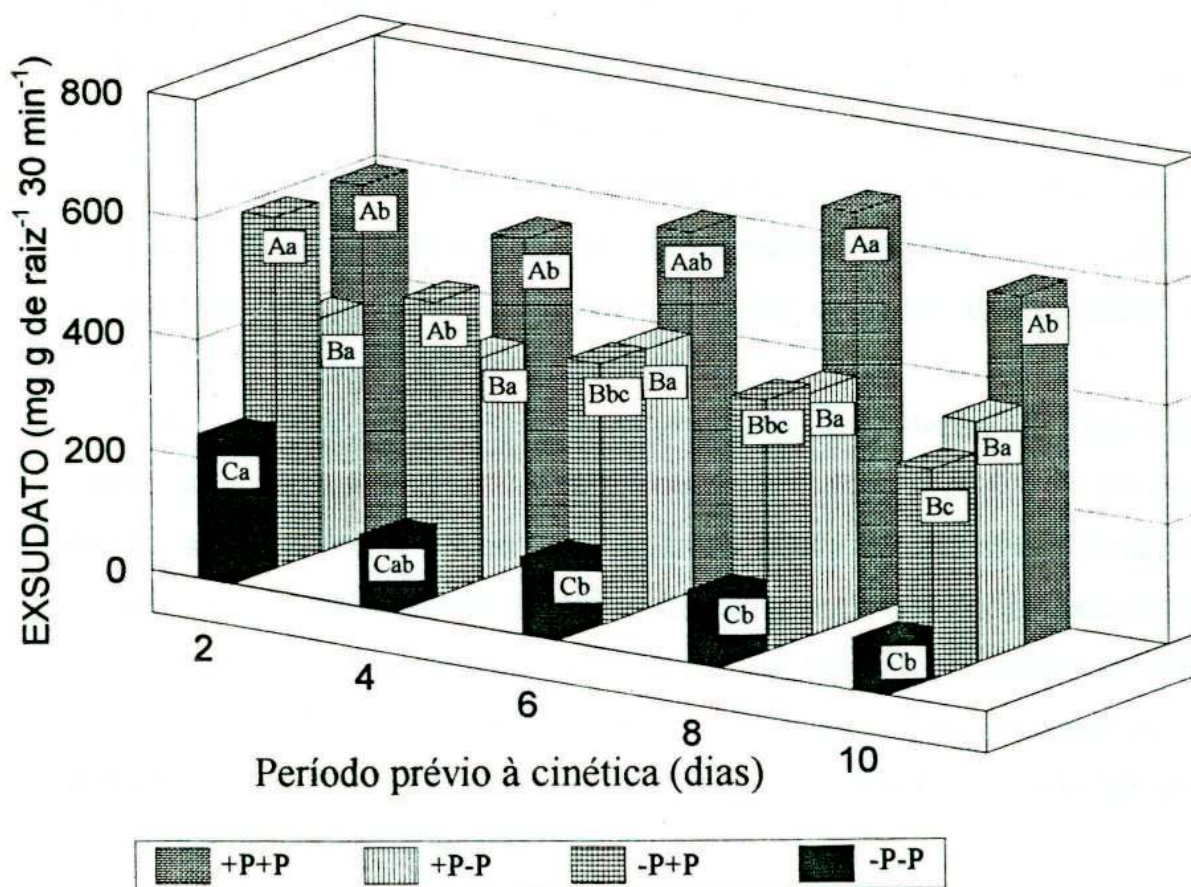


Figura 7 - Exsudato do xilema produzido por grama de matéria seca de raiz das plantas dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética), -P-P (submetidas a período prévio de omissão P e P ausente durante a cinética). Médias seguidas de mesma letra maiúscula dentro de período ou minúscula entre períodos não diferem pelo teste de Duncan a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.



RADIN e EIDENBOCK (1984), RADIN e MATTHEWS (1989), RADIN (1990) observaram que a deficiência de fósforo diminuiu a condutância hidráulica das raízes de algodão, porém não especificaram os mecanismos fisiológicos. Pode haver alterações nas propriedades das membranas das células do córtex radicular (RADIN e MATTHEWS, 1989). Segundo RUFTY Jr. et al. (1993), algum sinal (ATP, ABA) pode estar atuando, alterando as propriedades das membranas e afetando o transporte e o fluxo de água. Sendo o volume de exsudato função da pressão radicular, o incremento de absorção de amônio e nitrato causado pelo ressuprimento de fósforo (Figuras 1 a 6) poderia provocar redução do potencial osmótico radicular, aumentando o fluxo de água absorvida.

Até quatro dias de período prévio de omissão/não - omissão de fósforo, foi determinado o conteúdo de nitrogênio orgânico no exsudato do xilema; nos períodos de seis, oito e dez dias, foi determinado o conteúdo de nitrogênio total (Figura 8).

O conteúdo de nitrogênio no exsudato do xilema foi reduzido significativamente em plantas submetidas a todos os períodos prévios de omissão de fósforo e não - ressupridas com esse nutriente durante a cinética, com relação aos demais tratamentos. Portanto, o transporte de nitrogênio da raiz para a parte aérea foi restringido pela omissão prévia de fósforo. Até seis dias de omissão desse nutriente, o ressuprimento restabeleceu totalmente o conteúdo de nitrogênio, normalizando a translocação.

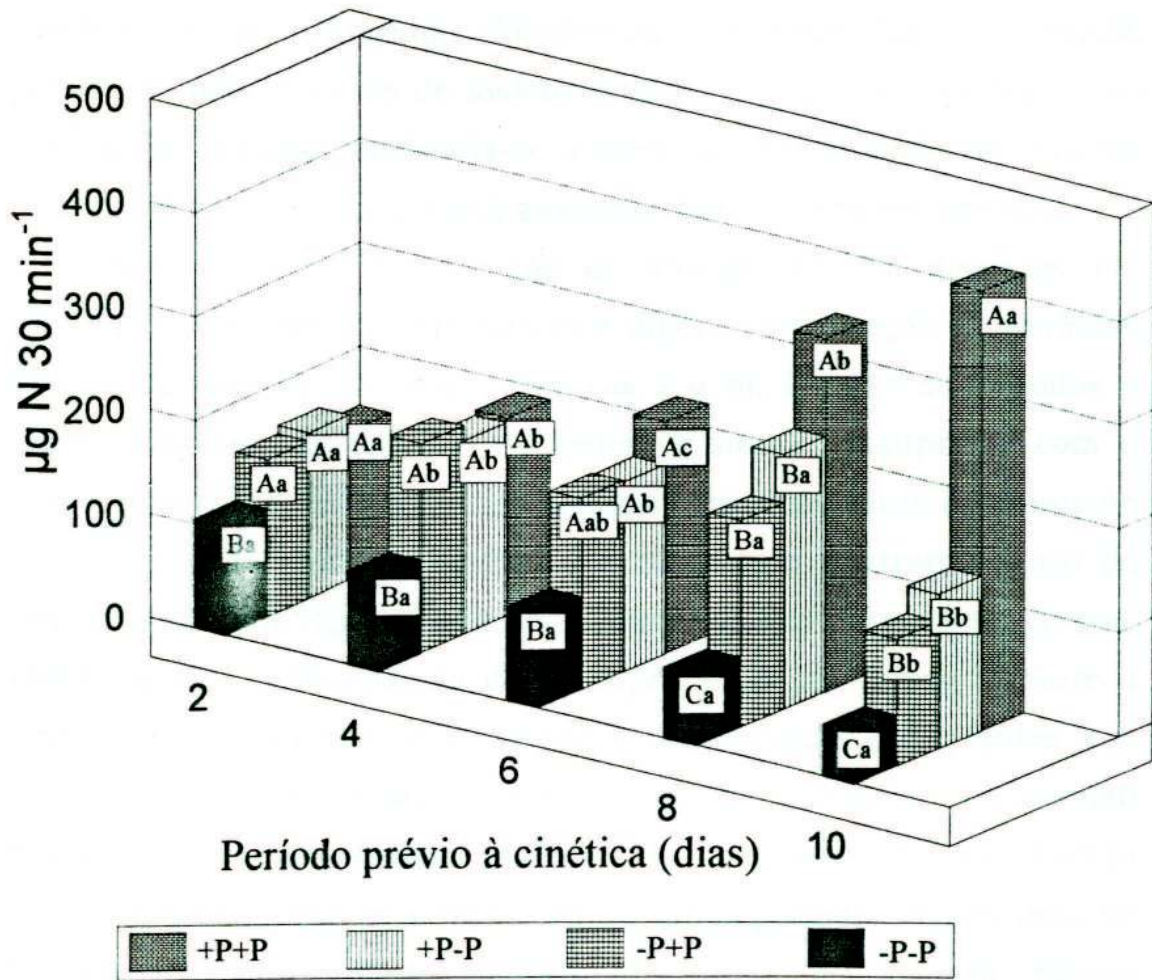


Figura 8 - Conteúdo de nitrogênio orgânico nos períodos de 2 e 4 dias, e nitrogênio total nos períodos 6, 8 e 10 dias no exsudato do xilema produzido por plantas de milho dos tratamentos +P+P (todo o período prévio sem omissão de P e P presente durante a cinética), +P-P (todo o período prévio sem omissão de P e P ausente durante a cinética), -P+P (submetidas a período prévio de omissão de P e P presente durante a cinética) e -P-P (submetidas a período prévio de omissão de P e P ausente durante a cinética). As médias seguidas de mesma letra maiúscula dentro de período ou minúscula entre períodos não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.



Nos períodos de oito e dez dias de omissão de fósforo, embora causando recuperação significativa, o ressuprimento não provocou incremento de conteúdo de nitrogênio que se comparasse ao do controle sempre suprido com fósforo. A ausência de fósforo durante o período de cinética em plantas não - submetidas a período prévio de omissão desse nutriente provocou tendência de redução (período de seis dias) e redução significativa (períodos de oito e dez dias) da translocação de nitrogênio. Considerando-se essa drástica redução provocada pela omissão de fósforo durante curto prazo (9 horas) no período de dez dias, evidencia-se a extrema sensibilidade do sistema de translocação de nitrogênio à ausência de fósforo nesse período.

A redução na translocação de nitrogênio pode dever-se, em parte, à menor absorção de nitrato e amônio em função de períodos prévios de omissão de fósforo (Figuras 1 a 6). Plantas submetidas a períodos prévios de omissão de fósforo e não - ressupridas com o nutriente durante a cinética apresentaram redução tanto da absorção de nitrato e de amônio (Figuras 1 a 6) quanto da translocação de nitrogênio (Figura 8), indicando associação parcial entre os processos. Porém, o efeito diferenciado do ressuprimento de fósforo durante a cinética nos processos de absorção e translocação das plantas sob omissão prévia de fósforo sugere independência (ao menos parcial) desses processos. Nessas plantas, o ressuprimento de fósforo restabeleceu totalmente a translocação até o período de seis dias de omissão desse nutriente (Figura 8). Ainda que tenha havido recuperação da absorção de nitrato e de amônio com o ressuprimento de fósforo (Figuras 1 a 6), as quantidades finais de nitrogênio absorvidas mantiveram-se abaixo do tratamento controle em função, principalmente, da menor absorção de nitrato ao final da cinética (Figura 1 e 2). Dessa maneira, até seis dias de omissão de fósforo, o efeito na translocação não parece estar ligado unicamente à absorção de nitrogênio. A translocação de nitrato no exsudato do xilema de milho foi considerada por MacKOWN et al. (1983) relativamente



independente da presença ou ausência de nitrato externo. Pools internos de nitrato sugeridos pelos autores e também por SHANER e BOYER (1976ab) e BELTON et al. (1985) poderiam justificar a independência, possivelmente parcial, dos processos de translocação (Figura 8) e absorção (Figuras 1 a 6) de nitrogênio com relação à omissão de fósforo.

É possível que a menor translocação de nitrogênio tenha causado acúmulo de nitrato ou produtos de assimilação (ambos presentes na seiva do xilema nas condições experimentais, segundo MURPHY e LEWIS, 1987), nas raízes. Uma vez acumulados, esses compostos poderiam causar inibição do tipo *feedback* na absorção de nitrato e de amônio. Porém, RUFTY Jr. et al. (1993) descrevem a ocorrência ordenada de eventos em função do estresse de fósforo, nos quais a absorção é afetada primeiramente com relação à translocação. São necessários trabalhos com períodos de omissão de fósforo inferiores a dois dias para verificação dessa hipótese em plantas de milho.

A redução na translocação de nitrogênio em função da omissão de fósforo na solução nutritiva (Figura 8) pode ser consequência da redução do fluxo de água para as raízes (Figura 7). O fluxo de água, carreando solutos, pode aumentar a taxa com que esses solutos alcançam a endoderme (PITMAN, 1977).

SCHOBERT e KOMOR (1990) observaram que o exsudato resultante da pressão radicular, analisado em plântulas de *Ricinus communis*, originou-se exclusivamente da transferência de solutos para o xilema e para o espaço livre do cilindro central. Segundo os autores, o fluxo de água é diretamente proporcional à liberação de solutos no xilema. A menor produção de exsudato do xilema das plantas submetidas à omissão de fósforo (Figura 7) indica menor fluxo de água. Isso pode ser resultado de alterações do potencial osmótico radicular em função da menor absorção de nitrato e amônio (Figuras 1 a 6) e menor translocação de nitrogênio (Figura 8) causados pela



omissão de fósforo. Efeitos semelhantes na produção de exsudato do xilema e no conteúdo de nitrogênio total no exsudato, causados pela omissão e ressuprimento de fósforo, indicam que o fluxo de água pode ter influenciado efetivamente a translocação de nitrogênio no xilema.

Os fluxos de íons do córtex em direção ao xilema parecem ser, em parte, ativos (PITMAN, 1977), podendo-se esperar componentes ativos e passivos ou fluxo passivo acoplado eletrogenicamente com o movimento de outro íons. Segundo o autor, está claro que o transporte de íons em direção ao xilema depende do metabolismo. EZETA e JACKSON (1975) observaram em plântulas de milho decapitadas extrema sensibilidade do processo de translocação de nitrato às alterações no metabolismo aeróbico e, possivelmente, à síntese de proteínas. Considerando a queda da concentração de fósforo total observada em plantas sob omissão de fósforo (Quadros 2 e 3), a provável deficiência de ATP nessas plantas pode ter reduzido o fluxo ativo de íons do córtex para o xilema.

O nitrogênio no exsudato do xilema, que teve seu conteúdo aumentado quando da recuperação da translocação em condições de ressuprimento de fósforo, pode ter-se originado de nitrato e de amônio absorvidos e, também, da ciclagem interna de composto nitrogenados. COOPER e CLARKSON (1989) sugerem que a ciclagem de amino-N entre parte aérea e raízes é um fenômeno importante em plantas jovens de cereais. Segundo os autores, mais de 50% do fluxo de nitrogênio no xilema representam nitrogênio que é ciclado entre parte aérea e raízes, preferencialmente ao nutriente que é diretamente transportado da solução do solo para esses órgãos.

Considerando-se que a omissão e o ressuprimento de fósforo alteraram a translocação de nitrogênio, o isolamento dos efeitos quando em suprimento de nitrato e de amônio, separadamente, buscando relacionamentos com as diferentes vias de assimilação de uma e de outra fonte, pode fornecer informações mais detalhadas acerca da natureza desse efeito.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observando o efeito inibitório de amônio sobre a absorção de nitrato, MACDUFF e JACKSON (1991) expõem as dificuldades de se conjecturar sobre o significado ecológico desse fenômeno, desconsiderando-se os argumentos baseados no custo energético relativo para assimilação de nitrato e de amônio. O custo energético parece, porém, ser o principal argumento, suficientemente consistente para explicar a inibição em áreas onde problemas energéticos em função de fornecimento de fósforo ocorrem com freqüência, como em solos tropicais. Nesse contexto, a inibição de um processo metabolicamente mais dispendioso (absorção de nitrato) em favor de outro mais econômico (absorção de amônio) parece ser uma estratégia bastante apropriada.

Enquanto o ressuprimento de fósforo aumentou significativamente os seus teores, em todos os períodos, tanto nas raízes quanto na parte aérea das plantas previamente submetidas à omissão desse nutriente (Quadros 2 e 3), a absorção de nitrato foi ativada acentuadamente com dois dias de omissão de fósforo, caindo bastante em magnitude de ativação, embora mantendo-se sempre detectável nos demais períodos (Figuras 1, 2 e 3). Disso se conclui que



a absorção de nitrato é mais sensível ao estresse de fósforo do que o próprio sistema de absorção de fósforo. Dessa maneira, a hipotética menor sensibilidade do sistema de absorção de fósforo, sendo avaliada pela maior capacidade de absorção desse nutriente em condições de ressuprimento, poderia refletir um mecanismo fisiológico de proteção de um sistema altamente dependente do status energético da célula (absorção de nitrogênio).

Em solos tropicais, constata-se, normalmente, uma combinação de características como baixo pH, alta atividade de alumínio e distrofismo, particularmente com relação aos teores de fósforo. Nesse contexto, espera-se limitação da atividade das bactérias nitrificadoras, podendo haver predominância de amônio como forma de nitrogênio disponível. Eventuais problemas de transporte de fósforo para as raízes das culturas, principalmente em ocasiões de queda do teor de umidade do solo abaixo da capacidade de campo (NOVAIS et al., 1990), podem acarretar problemas quanto à nutrição nitrogenada.

Foi constatada menor sensibilidade da absorção de amônio com relação à absorção de nitrato, em condições de omissão de fósforo. Disso se pode sugerir que, durante períodos de estresse de fósforo, as culturas estejam na dependência do nitrogênio amoniacal do solo. Dados recentes, obtidos pela aplicação de uréia em solos de cerrado, avaliaram em mais de 80% a proporção relativa de  $\text{NH}_4^+ / (\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+)$ , indicando condições desfavoráveis de nitrificação (COELHO, 1995). Dessa maneira, o quadro geral de fertilidade dos solos tropicais, particularmente a possível predominância de amônio sobre nitrato e, ainda, a possibilidade de períodos freqüentes de estresse de fósforo, pode refletir-se, em termos fisiológicos, na maior capacidade de absorção de amônio em plantas sob deficiência de fósforo. Práticas como a calagem, ao elevarem o pH do solo e, com isso, estimularem a nitrificação, fazem predominar a forma de nitrogênio nítrica. Considerada a dificuldade de se manterem teores adequados de fósforo na solução de solos de elevado fator capacidade, a



predominância da forma nítrica com relação à amoniacal colocaria em disponibilidade uma forma menos absorvida em condições de estresse de fósforo, e mais sujeita a perdas por lixiviação. Portanto, a decisão agronômica ligada ao manejo de pH, tendo em vista o nitrogênio, deve também estar baseada na maior adequação da forma nítrica ou amoniacal com relação ao suprimento de fósforo.

Houve menor produção de exsudato do xilema em plantas submetidas à omissão prévia de fósforo, sugerindo menor absorção de água. O fósforo parece estar estreitamente ligado à utilização de água, observando-se menor transpiração em plantas intactas sob deficiência daquele nutriente (PAYNE et al., 1992). Quedas dos teores de umidade do solo podem limitar o suprimento de fósforo, provocando a sua deficiência nutricional (NOVAIS et al., 1990). Por sua vez, essa deficiência desencadearia menor capacidade de absorção de água. Esse quadro reforça as conclusões de PAYNE et al. (1992) de que o suprimento de água em ambientes onde haja possibilidade de estresse hídrico não pode ser efetivamente manejado para produção sem que sejam observadas as limitações de fertilidade do solo. Provavelmente as características químicas de solos mais intemperizados, responsáveis pela elevada capacidade de sorção de fósforo, fazem com que essa atenção seja primordial em solos tropicais, principalmente os de cerrado onde veranicos são freqüentes. Uma vez reduzida a absorção de água, outros nutrientes, que tenham no fluxo em massa a principal forma de transporte para as raízes, podem ter sua absorção prejudicada. Assim sendo, é possível que os efeitos do estresse de fósforo possam estender-se ao transporte de outros íons da solução do solo para as raízes, via absorção de água.

Após períodos prévios de omissão de fósforo na solução nutritiva, o ressuprimento desse nutriente por apenas 9 horas foi capaz de recuperar, ainda que parcialmente nos períodos mais avançados, a absorção de nitrato e de amônio, a translocação de nitrogênio e a produção de exsudato do xilema. Portanto, torna-se



importante haver fósforo disponível quando da absorção de nitrogênio, principalmente para plantas que vieram de períodos prévios de deficiência de fósforo. Assim, devem-se buscar práticas agronômicas que possibilitem essa condição. A aplicação localizada de fósforo, evitando o aumento de volume de solo em contato com esse nutriente e a passagem para a fração não lábil, deveria ser vantajosa (NOVAIS et al., 1985). Porém, os autores observaram maior crescimento de milho em condições uniformes de aplicação em comparação à aplicação localizada. Dada a necessidade de fósforo disponível no momento de absorção de nitrogênio (seja nitrato ou amônio) em plantas expostas a deficiência prévia daquele nutriente, pode ser benéfica a adubação de cobertura com nitrogênio e também com fósforo, caso essa adubação seja capaz de aumentar, efetivamente, os teores disponíveis desse nutriente. Com uma adubação fosfatada de plantio adequadamente aplicada, mesmo não havendo ainda o “residual uniforme de fósforo” descrito por NOVAIS et al. (1985), a aplicação posterior desse nutriente pode trazer benefícios principalmente no que diz respeito à absorção de nitrogênio. Uma vez conhecida a dinâmica entre deficiência de fósforo e absorção de nitrogênio com relação à importância relativa das formas nitrato e amônio no contexto, e a velocidade dos fenômenos (reversibilidade), outras estratégias de adubação devem ser pesquisadas.

Embora compreendendo mecanismos complexos, a elucidação das respostas fisiológicas em condições de estresse pode ser buscada, desde que com objetivos bem definidos e técnicas compatíveis. Portanto, afiguram-se de extrema importância os estudos fisiológicos e bioquímicos da absorção de nutrientes e a tentativa de relacioná-los aos estudos de fertilidade, como forma de integrar planta e solo na busca de um manejo nutricional verdadeiramente adequado.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Em solos altamente intemperizados, a disponibilidade limitada de fósforo pode causar, com freqüência, estresse nutricional desse nutriente. A deficiência de fósforo pode induzir a deficiência de nitrogênio, estando a absorção do nutriente nitrogenado estreitamente relacionada ao status de fósforo da planta e do solo.

O objetivo deste trabalho foi identificar as principais alterações na absorção e translocação de nitrogênio em plantas de milho, ocasionadas pela omissão de fósforo, por diferentes períodos, na solução nutritiva. Plântulas do progenitor masculino do milho BR-201 foram crescidas por 7 dias em solução nutritiva completa, em casa de vegetação. A partir daí, o fósforo foi omitido de metade dos recipientes. Em câmara de crescimento, foram executadas cinéticas de absorção de nitrato e de amônio em plantas submetidas e não - submetidas à omissão de fósforo por períodos prévios de dois, quatro, seis, oito e dez dias, na ausência e presença de fósforo durante o período de cinética. Ao final de cada cinética, a solução inicial foi ressuprida, sendo as plantas, após uma hora, cortadas 1 cm acima do colo. Foi recolhido o exsudato do xilema produzido por 30 minutos, ao final dos quais as plantas foram colhidas e divididas em parte aérea e raízes. Foram avaliados produção de exsudato, conteúdo de nitrogênio translocado,



peso de matéria seca da parte aérea e raízes e teores de fósforo e nitrogênio total na matéria seca.

A omissão prévia de fósforo diminuiu a absorção de nitrato e de amônio, sendo a absorção de nitrato notadamente mais afetada. No caso do nitrato, períodos prévios de omissão de fósforo superiores a seis dias paralisaram completamente a absorção. O fósforo suprido durante a cinética reverteu, parcialmente, o efeito de diminuição de absorção de nitrato e de amônio em função da omissão prévia daquele nutriente. Essa reversão foi tanto maior quanto menor o período de omissão prévia de fósforo.

A produção de exsudato do xilema e o conteúdo de nitrogênio translocado da raiz para a parte aérea foram reduzidos pela omissão prévia de fósforo. Com o ressuprimento de fósforo durante a cinética, houve recuperação total da translocação de nitrogênio até seis dias de omissão prévia daquele nutriente e da produção de exsudato até quatro dias de omissão prévia. Os resultados sugerem a importância do fósforo, no momento da absorção, na manutenção das taxas de exsudação e na translocação de nitrogênio, especialmente em plantas vindas de períodos prévios de deficiência nutricional daquele nutriente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B.J.R., BODDEY, R.M., URQUIAGA, S.S. A rapid and sensitive flow injection technique for the analysis of ammonium in soil extracts. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.24, p.277-284, 1993.
- ALVES, V.M.C. **Frações de Fósforo, de Açúcares Solúveis e de Nitrogênio em Quatro Híbridos de Milho Submetidos à Omissão e ao Ressuprimento de Fósforo**. Viçosa, MG. 106p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.
- AMÂNCIO, S., SANTOS, H. Nitrate and ammonium assimilation by roots of maize (*Zea mays* L.) seedlings as investigated by in vivo <sup>15</sup>N-NMR. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.633-639, 1992.
- ANDREEVA, T.F., MAEVSKAYA, S. N., VOEVUDSKAYA, S. Yu et al. Interrelationship of photosynthesis, nitrogen assimilation, and growth processes during stress and adaptation to increasing phosphorus deficit in Mustard plants. **Soviet Plant Physiology**, v.39, p.170-174, 1992a.
- ANDREEVA, T.F., MAEVSKAYA, S.N., VOEVUDSKAYA, S. Yu. Interrelationship between photosynthesis and nitrogen metabolism in Mustarda plants under conditions of different phosphorus and nitrogen nutrition. **Soviet Plant Physiology**, v.39, p.438-442, 1992b.



- ARIMA, Y., KUMAZAWA, K. Evidence of ammonium assimilation via the glutamine synthetase-glutamate synthase system in rice seedling roots. *Plant and Cell Physiology*, v.18, p.1121-1129, 1977.
- BEHL, R., TISCHNER, R., RASCHKE, K. Induction of a high-capacity nitrate-uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low-capacity mechanism. *Planta*, v.176, p.235-240, 1988.
- \* BELTON, P.S., LEE, R.B., RATCLIFFE, R.G. A  $^{14}\text{N}$  nuclear magnetic resonance study of inorganic nitrogen metabolism in barley, maize and pea roots. *Journal of Experimental Botany*, v.36, p.190-210, 1985.
- BESFORD, R.T. Effect of phosphorus nutrition in peat on tomato plant growth and fruit development. *Plant and Soil*, v.51, p.341-53, 1979.
- BLOOM, A.J., SUKRAPANNA, S.S., WARNER, R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology*, v.99, p.1294-1301, 1992.
- BRETELER, H., ARNOZIST, P.A. Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Phytochemistry*, v.24, p.653-657, 1985.
- BUTZ, R.G., JACKSON, W.A. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry*, v.16, p.409-417, 1977.
- CHAPIN, F.S. III, BIELESKI, R.L. Mild phosphorus stress in barley and a related low-phosphorus-adapted barleygrass: phosphorus fractions and phosphate absorption in relation to growth. *Physiologia Plantarum*, v.54, p.309-317, 1982.
- CHERNYAVSKAYA, T.N., TUEVA, O.F. Assimilation of nitrogen by plants under conditions of phosphorus deficiency. *Fiziologiya Rastenii*, v.22, p.1199-1205, 1975.

CLARKSON, D.T. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annual Review of Plant Physiology*, v.36, p.77-115, 1985.

COELHO, A.M. Efeito de níveis de N-uréia na dinâmica de amônia e nitrato em latossolo cultivado e irrigado. In: CONGRESSO NACIONAL DE LA CIENCIA DEL SUELO, 7, 1995, Temuco, Chile. *Resumen...* Temuco: Universidad de la Frontera, 1995. p.6.

\* COOPER, H.D., CLARKSON, D.T. Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals – A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *Journal of Experimental Botany*, v.40, 753-762, 1989.

DHUGGA, K.S., WAINES, J.G., LEONARD, R.T. Correlated induction of nitrate uptake and membrane polypeptides in corn roots. *Plant Physiology*, v.87, p.120-125, 1988.

DODDEMA, H., TELKAMP, G.P. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiologia Plantarum*, v.45, p.332-38, 1979.

DUFF, S.M.G., MOORHEAD, G.B.G., LEFEBVRE, D.D. et al. Phosphate starvation inducible 'bypasses' of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology*, v.90, p.1275-1278, 1989.

EPSTEIN, E., HAGEN, C.E. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology*, v.27, p.457-474, 1952.

\* EZETA, F.N., JACKSON, W.A. Nitrate translocation by detopped corn seedlings. *Plant Physiology*, v.56, p.148-156, 1975.

FOY, C.D., FLEMING, A.L., BURNS, G.P. et al. Characterization of differential aluminium tolerance among varieties of wheat and barley. *Soil Science Society of America Proceedings*, v.31, p.513-521, 1967.

GLASS, A.D.M., SIDDIQI, M.Y., RUTH, T.J. et al. Studies of the uptake of nitrate in barley. II Energetics. *Plant Physiology*, v.93, p.1585-1589, 1990.



- GLASS, A.D.M., SHAFF, J.E., KOCHIAN, L.V. Studies of the uptake of nitrate in barley. IV Electrophysiology. *Plant Physiology*, v.99, p.456-463, 1992.
- GLASS, A.D.M., SIDDIQI, M.Y. Nitrogen absorption by plant roots, In: SRIVASTAVA, H.S., SINGH, R.P. (Eds.), *Nitrogen nutrition in higher plants*. New Delhi: Associated Publishing Co., 1995. p.21-56.
- GOJON, A., SOUSSANA, J-F, PASSAMA, L. et al. Nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordeum vulgare* L.) and corn (*Zea mays* L.) seedlings. I.  $^{15}\text{N}$  study. *Plant Physiology*, v.82, p.254-260, 1986.
- GOYAL, S.S., HUFFAKER, R.C. The uptake of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NH}_4^+$  by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. I. Induction and kinetics of transport systems. *Plant Physiology*, v.82, p.1051-1056, 1986.
- HOLE, D.J., EMRAN, A.M., FARES, Y. et al. Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiology*, v.93, p.642-647, 1990.
- ISRAEL, D.W., RUFTY Jr., T.W. Influence of phosphorus nutrition on phosphorus and nitrogen utilization efficiencies and associated physiological responses in soybean. *Crop Science*, v.28, p.954-960, 1988.
- IVANKO, S., INGVERSEN, J. Investigation on the assimilation of nitrogen by maize roots and the transport of some major nitrogen compounds by xylem sap. I. Nitrate and ammonia uptake and assimilation in the major nitrogen fractions of nitrogen-starved maize roots. *Physiologia Plantarum*, v.24, p.59-65, 1971.
- JACKSON, W.A., FLESHER, D., HAGEMAN, R.H. Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant Physiology*, v.51, p.120-127, 1973.
- JOHNSON, I.R. Plant respiration in relation to growth, maintenance, ion uptake and nitrogen assimilation. *Plant Cell and Environment*, v.13, p.319-328, 1990.

- JOY, K.W. Ammonia, glutamine, and asparagine: a carbon-nitrogen interface. *Canadian Journal of Botany*, v.66, p.2103-2109, 1988.
- KAMPHAKE, L.J., HANNAH; S.A., COHEN, J.M. Automated analysis for nitrate by hidrazine reduction. *Water Research*, v.7, p.205-216, 1967.
- KATO, Y. Nitrogen nutrition and metabolism of soybeans. *Japan Agricultural Research Quaterly*, v.11, p.141-144, 1977.
- KING, B.F., SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M.. Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity - implications for nitrate influx. *Plant Physiology*, v.99, p.1582-1589, 1992.
- KING, B.J., SIDDIQI, M.Y., RUTH, T.J. et al. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiology*, v.102, p.1279-1286, 1993.
- KLEINER, D. The transport of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  across biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.639, p.41-52, 1981.
- LEE, R.B. Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Annals of Botany*, v.50, p.429-449, 1982.
- LEE, R.B., DREW, M.C. Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *Journal of Experimental Botany*, p.40, p.741-752, 1989.
- LEE, R.B., RATCLIFFE, R.G. Observations on the subcellular distribution of the ammonium ion in maize root tissue using in-vivo  $^{14}\text{N}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, v.183, p.359-367, 1991.



LEE, R.B., PURVES, J.V., RATCLIFFE, R.G. et al. Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *Journal of Experimental Botany*, v.43, p.1385-1396, 1992.

LEE, R.B., AYLING, M.S. The effect of methionine sulphoximine on the absorption of ammonium by maize and barley roots over short periods. *Journal of Experimental Botany*, v.44, p.53-63, 1993.

LEWIS, D.A.M., CHADWICK, S., WHITHERS, J. The assimilation of ammonium by barley roots. *Planta*, v.159, p.483-486, 1983.

LI, X-N., ASHIHARA, H. Effects of inorganic phosphate on sugar catabolism by suspension-cultured *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, v.29, p.457-500, 1990.

MACDUFF, J.H., JACKSON, S.B. Growth and preferences for ammonium or nitrate uptake by barley in relation to root temperature. *Journal of Experimental Botany*, v.42, p.521-530, 1991.

MACKLON, A.E.S., RON, M.M., SIM, A. Cortical cell fluxes of ammonium and nitrate in excised root segments of *Allium cepa* L.; studies using <sup>15</sup>N. *Journal of Experimental Botany*, v.41, p.359-370, 1990.

\* MacKOWN, C.T., JACKSON, W.A., VOLK, R.J. Partitioning of previously-accumulated nitrate to translocation, reduction, and efflux in corn roots. *Planta*, v.157, 8-14, 1983.

McCLURE, P.R., KOCHIAN, L.V., SPANSWICK, R.M. et al. Evidence for contransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiology*, v.93, p.281-289, 1990a.

McCLURE, P.R., KOCHIAN, L.V., SPANSWICK, R.M. et al. Evidence for contransport of nitrate and protons in maize roots. II Measurement of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and H<sup>+</sup> fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology*, v.93, 290-294, 1990b.

MAGALHÃES, J.R., HUBER, D.M. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. **Fertilizer Research**, v.21, p.1-6, 1989.

MAGALHÃES, J.R., HUBER, D.M., TSAI, C.Y. Evidence of increased <sup>15</sup>N-ammonium assimilation in tomato plants with exogenous  $\alpha$ -kethoglutarate. **Plant Science**, v.85, p.135-141, 1992.

MAGALHÃES, J.R., HUBER, D.M., TSAI, C.Y. Influence of the form of nitrogen on ammonium, amino acids and N-assimilating enzyme activity in maize genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, 747-763, 1995.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1989. 201 p.

MENGEL, K., VIRO, M. The significance of plant energy status for the uptake and incorporation of NH<sub>4</sub>-nitrogen by young rice plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.24, p.407-416, 1978.

MIFLIN, B.J., LEA, P.J. Ammonia assimilation, In: MIFLIN B.J. (Ed.), **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1980. v.5, p.169-202.

MORGAN, M.A., JACKSON, W.A. Inward and outward movement of ammonium in root systems: transient responses during recovery from nitrogen deprivation in presence of ammonium. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p.179-191, 1988.

MURPHY, A.T., LEWIS, O.A.M. Effect of nitrogen feeding source on the supply of nitrogen from root to shoot and the site of nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L. CV. R201). **New Phytologist**, v.107, p.327-333, 1987.

NOVAIS, R.F., FERREIRA, R.P., NEVES, J.C.L. et al. Absorção de fósforo e crescimento do milho com sistema radicular parcialmente exposto a fontes de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.749-754, 1985.



NOVAIS, R.F., NEVES, J.C.L., BARROS, N.F. Aspectos físico-químicos envolvidos na fixação de fósforo no solo. In: ENCONTRO NACIONAL DA ROCHA FOSFÁTICA 5, 1990, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: POTAFOS, 1990. p.133-164.

PAYNE, W.A., DREW, M.C., HOSSNER, L.R. et al. Soil phosphorus availability and pearl millet water-use efficiency. **Crop Science**, v.32, p.1010-1015, 1992.

\* PITMAN, M.G. Ion transport into the xylem. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.71-78, 1977.

PRUDEN, G., KALEMBASA, S.J., JENKINSON, D.S. Reduction of nitrate prior to kjeldahl digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.36, p.71-73, 1985.

QIU, J., ISRAEL, D.W. Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus-deficient soybean plants. **Plant Physiology**, v.98, p.316-323, 1992.

RABE, E., LOVATT, C.J. *de novo* arginine biosynthesis in leaves of phosphorus deficient *Citrus* and *Poncirus* Species. **Plant Physiology**, v.76, p.747-752, 1984.

RABE, E., LOVATT, C.J. Increased arginine biosynthesis during phosphorus deficiency. **Plant Physiology**, v.81, p.774-779, 1986.

\* RADIN, J.W., EIDENBOCK, M.P. Hydraulic conductance as a factor limiting leaf expansion of phosphorus-deficient cotton plants. **Plant Physiology**, v.75, p.372-377, 1984.

\* RADIN, J.W., MATTHEWS, M.A. Water properties of cortical cells in roots of nitrogen- and phosphorus-deficient cotton seedlings. **Plant Physiology**, v.89, p.264-268, 1989.

RADIN, J.W. Responses of transpiration and hydraulic conductance to root temperature in nitrogen- and phosphorus-deficient cotton seedlings. **Plant Physiology**, v.92, p.855-857, 1990.

RAO, M., FREDEEN, A.L., TERRY, N. Influence of phosphorus limitation on photosynthesis, carbon allocation and partitioning in sugar beet and soybean grown with a short photoperiod. **Plant Physiology Biochemie**, v.31, p.223-231, 1993.

RHODES, D., SIMS, A.P., FOLKES, B.F. Pathway of ammonia assimilation in illuminated *Lemna minor* L. **Phytochemistry**, v.19, p.357-365, 1980.

RHODES, D., DEAL, L., HAWORTH, P. et al. Amino acid metabolism of *Lemna minor*. I. Responses to methionine sulfoximine. **Plant Physiology**, v.82, p.1057-1062, 1986.

RUFTY Jr., T.W., MacKOWN, C.T., VOLK, R.J. Effects of altered carbohydrate availability on whole-plant assimilation of  $^{15}\text{NO}_3^{-1}$ . **Plant Physiology**, v.89, p.457-463, 1989.

RUFTY Jr., T.W., MacKOWN, C.T., ISRAEL, D.W. Phosphorus stress effects on assimilation of nitrate. **Plant Physiology**, v.94, p.328-33, 1990.

RUFTY Jr., T.W., SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M. et al. Altered  $^{13}\text{NO}_3^{-}$  influx in phosphorus limited plants. **Plant Science**, v.76, p.43-48, 1991.

\*RUFTY Jr., T.W., ISRAEL, D.W., VOLK, R.J. et al. Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.879-91, 1993.

RYCHTER, A.M., MIKULSKA, M. The relationship between phosphate status and cyanide-resistant respiration in bean roots. **Physiologia Plantarum**, v.79, p.663-667, 1990.

RYCHTER, A.M., CHAUVEAU, M., BOMSEL, J.-L. et al. The effect of phosphate deficiency on mitochondrial activity and adenylate levels in bean roots. **Physiologia Plantarum**, v.84, p.80-86, 1992.



SASAKAWA, H., YAMAMOTO, Y. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. Influences of light, temperature, oxygen concentration, exogenous sucrose, and metabolic inhibitors. **Plant Physiology**, v.62, p.665-669, 1978.

SCHJØRRING, J.K. Nitrate and ammonium absorption by plants growing at a sufficient or insufficient level of phosphorus in nutrient solutions. In: Lambers, H. (Ed.), **Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. p.53-58.

\* SCHOBERT, C., KOMOR, E. Transfer of amino acids and nitrate from the roots into the xylem of *Ricinus communis* seedlings. **Planta**, v.181, p.85-90, 1990.

SECHLEY, K.A., YAMAYA, T., OAKS, A. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. **International Review of Cytology**, v.134, p.85-163, 1992.

\* SHANER, D.L., BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. **Plant Physiology**, v.58, p.499-504, 1976a.

SHANER, D.L., BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. **Plant Physiology**, v.58, p.505-509, 1976b.

SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M., RUTH, T.J. et al. Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using  $^{13}\text{NO}_3^-$ . **Plant Physiology**, v.90, p.806-813, 1989.

SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M., RUTH, T.J. et al. Studies of the uptake of nitrate in Barley. I. Kinetics of  $^{13}\text{NO}_3^-$  influx. **Plant Physiology**, v.93, p.1426-1432, 1990.

SILVA, D.J. da. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 1981. 166p.

- THEODOROU, M.E., ELRIFI, I.R., TURPIN, D.H. et al. Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. **Plant Physiology**, v.95, p.1089-1095, 1991.
- ULLRICH, W.R., LARSSON, M., LARSSON, C-M et al. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G 1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. **Physiologia Plantarum**, v.61, p.369-376, 1984.
- USUDA, H., SHIMOGAWARA, K. Phosphate deficiency in maize. I. Leaf phosphate status, growth, photosynthesis and carbon partitioning. **Plant Cell Physiology**, v.32, p.497-504, 1991.
- VAUGHN, K.C., CAMPBELL, W.C. Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. **Plant Physiology**, v.88, p.1354-1357, 1988.
- VONA, V., Di MARTINO RIGANO, V., ESPOSITO, S. et al. Growth, photosynthesis, respiration, and intracellular free amino acid profiles in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. Effect of nutrient limitation and resupply. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.652-658, 1992.
- WANG, M.Y., SIDDIQI, M.Y., RUTH, T.J. et al. Ammonium uptake by rice roots. I. Fluxes and subcellular distribution of  $^{13}\text{NH}_4^+$ . **Plant Physiology**, v.103, p.1249-1258, 1993a.
- WANG, M.Y., SIDDIQI, M.Y., RUTH, T.J. et al. II. Kinetics of  $^{13}\text{NH}_4^+$  influx across the plasmalemma. **Plant Physiology**, v.103, p.1259-1267, 1993b.
- WANG, M.Y., GLASS, A.D.M., SHAFF, J.E. et al. Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. **Plant Physiology**, v.104, p.899-906, 1994.
- WARNER, R.L., HUFFAKER, R.C. Nitrate transport is independent of NADH and NADP(H) nitrate reductases in Barley seedlings. **Plant Physiology**, v.91, p.947-953, 1989.



WATANABE, M., KOHATA, K., KUNUGRI, M.  $^{31}\text{P}$  Nuclear magnetic resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* (HADA) HADA (RAPHIDOPHYCEAE). ***Journal of Phycology***, v.23, p.54-62, 1987.

YOUNGDAHL, L.J., PACHECO, R.; STREET, J.J. et al. The kinetics of ammonium and nitrate uptake by young rice plants. ***Plant and Soil***, v.69, p.225-232, 1982.

ZAGATTO, E.A.G., JACINTHO, A.O., REIS, B.F. et al. ***Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo***. Piracicaba: CENA, 1981. 20p.

**APÊNDICE**



## APÊNDICE

Quadro 1A - Quadrados médios da análise de variância da característica matéria seca da parte aérea e da raiz de plantas de milho submetidas e não - submetidas a períodos prévios de omissão de fósforo na solução nutritiva, na presença e ausência de fósforo durante a cinética

F.V.	G.L.	Quadrados Médios					Quadrados Médios				
		Matéria Seca da Parte Aérea					Matéria Seca de Raiz				
		P2	P4	P6	P8	P10	P2	P4	P6	P8	P10
Bloco	3	0,012	0,015	0,030	0,046	0,396	0,001	0,001	0,010	0,003	0,027
OP	1	0,003 <sup>o</sup>	0,360**	2,714**	12,51**	40,93**	0,004	0,002	0,005	0,009	0,003
PP	1	0,000**	0,084**	0,015	0,037	0,001	0,001	0,020 <sup>o</sup>	0,002	0,016	0,034
OPxPP	1	0,004 <sup>o</sup>	0,148**	0,089	0,003	0,003	0,000**	0,014 <sup>o</sup>	0,000	0,001	0,020
Resíduo	9	0,040	0,009	0,057	0,182	0,478	0,005	0,004	0,006	0,006	0,040
C.V. (%)		14,48	4,71	8,68	12,84	16,07	16,72	10,00	10,56	9,16	17,39

o, \*, \*\* Significativo, pelo teste de F, a 10%, 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

P: período prévio à cinética, OP: omissão prévia de fósforo, PP: presença de fósforo durante a cinética.

Quadro 2A - Quadrados médios da análise de variância das características teor de fósforo total e nitrogênio total da parte aérea e da raiz das plantas de milho submetidas e não - submetidas a períodos prévios de omissão de fósforo na solução nutritiva, na ausência e presença de fósforo durante a cinética

F.V.	G.L.	Quadrados Médios			
		Teor de Fósforo Total na Matéria Seca		Teor de Nitrogênio Total na Matéria Seca	
		Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
Período	4	0,078**	0,024**	0,591**	0,580**
Bloco (P)	15	0,000	0,000	0,029°	0,007
OP	1	1,399**	0,782**	2,042**	6,183**
PxOP	4	0,002**	0,003**	0,050*	0,365**
PP	1	0,131**	0,324**	0,133**	0,042
PxPP	4	0,000	0,001	0,033°	0,023
OPxPP	1	0,027**	0,025**	0,005	0,071
PxOPxPP	4	0,000	0,001	0,010	0,148**
Resíduo	45	0,00037	0,001	0,016	0,041
C.V. (%)		5,55	10,02	4,01	6,55

o, \*, \*\* Significativo, pelo teste de F, a 10%, 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

P: período prévio à cinética, OP: omissão prévia de fósforo, PP: presença de fósforo durante a cinética



Quadro 3A - Quadrados médios da análise de variância <sup>conjunta</sup> das características conteúdo de nitrogênio orgânico e conteúdo de nitrogênio total no exsudato do xilema, e peso do exsudato em plantas de milho submetidas e não - submetidas a períodos prévios de omissão de fósforo na solução nutritiva, na presença e ausência de fósforo durante a cinética

F.V.	Conteúdo de Nitrogênio Orgânico no Exsudato do Xilema		Conteúdo de Nitrogênio Total no Exsudato do Xilema		Peso do Exsudato do Xilema	
	G.L.	Quadrados Médios	G.L.	Quadrados Médios	G.L.	Quadrados Médios
Período	1	6179,191**	2	7710,146*	4	18157,126**
Bloco(P)	6	691,064*	9	2169,340	15	4603,644
OP	1	8767,826**	1	239033,652**	1	769858,415**
PxOP	1	802,151°	2	19031,534**	4	32605,611**
PP	1	10824,464**	1	166646,092**	1	1278570,683**
PxPP	1	3824,997**	2	11300,722**	4	2738,828
OPxPP	1	14593,111**	1	4252,596	1	58637,892**
PxOPxPP	1	974,182*	2	20398,575**	4	3051,101
Resíduo	18	208,785	27	1879,105	45	3623,520
C.V. (%)		9,45		22,89		15,04

o, \*, \*\* Significativo, pelo teste de F, a 10%, 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

P: período prévio à cinética, OP: omissão prévia de fósforo, PP: presença de fósforo durante a cinética.