

## VARIAÇÃO DIÁRIA DA ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO

Ana Paula Neto<sup>1</sup>; Rodrigo Estevam Munhoz de Almeida<sup>2</sup>; Rafael Tadeu de Assis<sup>1</sup>; André Luís Garcia Alves<sup>3</sup>; Tiago Tezotto<sup>1</sup> e José Laércio Favarin<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Mestrandos em Agronomia – ESALQ/USP. Bolsista CNPq. E-mail: apneto@esalq.usp.br

<sup>2</sup> MSc. Em Agronomia – área de concentração em Fitotecnia – ESALQ/USP

<sup>3</sup> Estudante de Agronomia – ESALQ/USP.

<sup>4</sup> Professor Associado do Departamento de Produção Vegetal – ESALQ/USP. E-mail: jlfavari@esalq.usp.br.

**RESUMO:** O nitrogênio absorvido na forma de nitrato para ser assimilado pela planta é catalisado pela enzima redutase do nitrato (RN). A atividade desta enzima é influenciada, principalmente, pela luz e pelo teor de nitrato. Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a atividade da RN e o teor de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides em plantas em produção, em condições de campo, em diferentes horários (7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 h), bem como verificar a diferença da atividade nas folhas que recebem radiação solar pela manhã, a tarde e naquelas que não recebem radiação direta. A atividade da redutase do nitrato foi maior em folhas expostas ao sol nascente, bem como o teor de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides, enquanto as folhas sombreadas apresentaram os menores valores para essas variáveis. Nas folhas expostas ao sol poente obteve menores atividades da RN e dos pigmentos. Em todas as exposições luminosas a maior atividade da RN foi observada às 12:00 h e os menores valores ocorreram às 22:00 h.

**Palavras-chave:** nitrogênio, radiação solar, clorofila, carotenóides.

## DAILY VARIATION OF ENZYME NITRATE REDUCTASE

**ABSTRACT:** The nitrogen absorbed in the form of nitrate to be assimilated by plants is catalyzed by the enzyme nitrate reductase (NR). The activity of this enzyme is influenced, mainly, by the light and nitrate levels. This research was carried out to assess the activity of NR and content of chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids in plants under production, on the field at different times (7:00 h., 12:00 h., 17:00 h. and 22:00 h.), and examine the difference in activity of leaves that receives sunlight in the morning, afternoon and those who do not receive direct radiation. The reductase activity of nitrate was higher in leaves exposed to the rising sun, as well as the content of chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids, while shaded leaves showed the lowest values for these variables. The leaves exposed to the sun west received minor activities of NR and pigments. In all light exposure was determined highest activity of NR at 12:00 h. and the lowest values occurring at 22:00 h.

**Key words:** nitrogen, sunlight (solar radiation), chlorophyll, carotenoids.

## INTRODUÇÃO

Originado em sub-bosque, o café é conduzido em diversos ambientes, com produtividades superiores quando cultivado a pleno-sol, o que evidencia a sua capacidade de adaptação à elevada irradiância, embora mantenha algumas características de planta de sombra, como a baixa relação entre clorofilas *a* e *b* (Fahl *et al.*, 1994; DaMatta & Maestri, 1997).

As características morfológicas e fisiológicas foliares geralmente variam com a posição na copa, em razão da diferença de ambiente lumínico (Hollinger, 1989; Ishida *et al.*, 1999). As folhas sombreadas são mais eficientes na assimilação do carbono (CO<sub>2</sub>) do que as folhas expostas ao sol, já que nos trópicos a radiação solar, invariavelmente, supera em 3 a 5 vezes o limite de saturação lumínica. Em razão dessa característica é comum a fotoinibição provocada pela saturação do aparelho fotossintético sob elevada irradiância (DaMatta & Maestri, 1997). Além disso, a temperatura foliar pode alcançar 5° C a 20° C a mais do que a temperatura do ar, chegando até a 50° C ao meio-dia, nas condições de Piracicaba, o que provoca danos no tecido foliar. Hernandez *et al.* (1989) e Marin *et al.* (2003) verificaram que a redução da energia radiante às plantas, por meio do sombreamento, diminuiu a transpiração em cerca de 10 % comparativamente aos valores determinados nas plantas a pleno sol.

O teor de nitrogênio nas plantas é um fator decisivo para a proteção das plantas contra a fotoinibição da fotossíntese quando os vegetais são expostos a altas irradiâncias. (Nunes *et al.*, 1993; Fahl *et al.*, 1994; Ramalho *et al.*, 1999 e 2000). A maioria do N é usada na síntese de componentes do aparato fotossintético (Evans, 1989).

O nitrogênio é absorvido pelas plantas, principalmente na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e, posteriormente, é assimilado na forma de compostos orgânicos nitrogenados. A redutase do nitrato (RN) catalisa o primeiro passo enzimático da assimilação do nitrogênio pela redução do nitrato a nitrito (Oaks, 1994; Yaneva *et al.*, 2000). Durante a assimilação do nitrogênio em compostos orgânicos, o nitrato é, primeiramente, reduzido a forma amoniacal por meio de processo que envolve a participação de duas enzimas - a redutase do nitrato (RN) e a redutase do nitrito (RNi) (Crawford *et al.*, 2000).

A luz e o teor de nitrato são fatores importantes na indução e manutenção da atividade da RN nos tecidos vegetais (Hageman & Flesher, 1960; Beevers & Hageman, 1969; Galangau *et al.*, 1988; Vincentz *et al.*, 1993). De

acordo com diversos autores a atividade dessa enzima nas folhas aumenta durante as horas de luz e decresce no escuro para muitas espécies (Harper & Hageman, 1972; Lewis *et al.*, 1982; Hipkin *et al.*, 1984).

A RN foliar correlaciona positivamente com a assimilação de carbono em plantas de café submetido a diferentes regimes de irradiâncias. Como muitas outras enzimas, o ritmo circadiano em RN tem sido reportado por muitas espécies, com aumento durante as horas de luz, cujo pico ocorre ao meio-dia e diminui durante o período escuro. No entanto, diversos trabalhos verificaram que a atividade da RN em folhas de café jovens diminui continuamente durante o período de luz e aumenta durante a noite. (Cordeiro *et al.*, 1984; Alves *et al.*, 1985; Carelli, 1987; Queiroz *et al.*, 1993b; Ramalho *et al.*, 1999). Resultados obtidos por Alves *et al.* 1985 mostraram comportamento similar em plantas de 6 meses de idade, mas não em plantas de 12 meses. Este comportamento favorece o crescimento das mudas de café, em particular, quando as mesmas são expostas a 50 % de luz, conforme estudos realizados por Paiva (2001). Esta é, certamente, a razão porque as mudas de café são formadas em viveiros expostas a 50 % de luz (meia sombra).

A habilidade das plantas do cafeeiro aclimatar a várias irradiâncias pode ser a causa, ao menos em parte, das variações de resultados encontrados na literatura acerca da influência da luz na assimilação de carbono e assimilação de N. (Fahl *et al.*, 1994; Andrade Netto, 2005; DaMatta, 2004).

Ainda não foi, devidamente, explicada as razões do comportamento diferencial da redutase do nitrato (RN) em cafeeiro em relação à maioria das plantas, bem como são escassas as informações sobre a atividade da RN em cafeeiros adultos. Estas observações justificam a realização de pesquisa exploratória sobre o assunto, com a finalidade de ampliar os conhecimentos nessa área da ciência agrônoma.

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a atividade da RN e o teor de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides em plantas em produção, em condições de campo, em diferentes horários (7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 horas), bem como verificar a diferença da atividade nas folhas que recebem radiação do sol nascente, poente e aquelas que não recebem radiação direta.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no mês de março de 2009, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), no município de Piracicaba – SP. Para as avaliações foram utilizadas 5 plantas de *Coffea arabica*, cv. Obatã, plantadas num espaçamento 3,4 x 0,9 m, com 7 anos de idade. A adubação foi feita usando nitrogênio (N) e potássio (K) numa única aplicação de 250 kg.ha<sup>-1</sup> de N e K, a qual foi realizada no mês de fevereiro.

Foi determinada a atividade da enzima redutase do nitrato – RN ( $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) em quatro posições nas plantas, empregando-se o ensaio *in vivo* modificado por Queiroz *et al.* (1991), com intervalo de 5 h entre as avaliações, efetuadas às 7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 h. Esse procedimento foi adotado para permitir a comparação da ação enzimática nas diferentes condições de luminosidade do experimento ao longo do período luminoso e a noite, em razão da variação da irradiância.

As amostras de tecido fresco foram coletadas e lavadas com água deionizada. Em seguida, retiraram-se discos foliares de 100 mg de massa e 0,5 cm de diâmetro (Figura 1), os quais foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução tampão PO<sub>4</sub>, pH 7,4 50 mM + KNO<sub>3</sub> 200 mM.

Essas amostras foram infiltradas a vácuo, utilizando-se uma seringa, para aumentar a penetração da solução nos tecidos. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo o material vegetal foram incubados em banho maria a 30° C por 1 hora ao abrigo da luz, envoltas com folha de alumínio. A paralisação da reação foi feita com a adição de 1 mL de sulfanilamida a 1 % em HCl 2 N e, a seguir, adicionou-se 1 mL de  $\alpha$ -naftilenodiamino 0,05 %.

A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da enzima determinada pela quantidade de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) produzida, comparando os valores obtidos com a curva padrão para esse íon, previamente estabelecida.

Na determinação do teor de clorofila foi adotada a metodologia modificada de Lee *et al.* (1987) e Moran (1982). Foram analisados 0,1 g de material vegetal fresco de cada amostra. Estes discos foliares foram incubados a temperatura ambiente em eppendorf contendo 1 mL de N, N-Dimetilformamida durante 72 horas, permanecendo no escuro. Após este período os pigmentos diluídos na solução foram determinados em espectrofotômetro Hitachi modelo U-3210, a 480, 646,8 e 663,8 nm.

Para determinar a quantidade de Clorofila *a*, *b* e total de cada amostra foram feitos os seguintes cálculos: Clorofila A: 0,0127\*ABS 663 -0,00269\*ABS 645; Clorofila B: 0,0229\*ABS 645 -0,00468\*ABS 663 e Clorofila total: clorofila A + clorofila B

A determinação a quantidade de carotenóides foi feita a partir da seguinte fórmula (1000\*ABS 480 - 1,12\*Chlor A - 34,07\*Chlor B/245).

O experimento foi realizado de acordo com delineamento inteiramente casualizado, em cada planta de cafeeiro foi considerado como uma repetição. Os resultados obtidos para cada variável estudada foram submetidos à análise de variância para a comparação das médias entre os tratamentos. Para análise estatística dos dados utilizou-se o programa estatístico ASSISTATE.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

A atividade da redutase do nitrato aumentou durante o período luminoso em ambas as faces da planta, voltadas para o sol nascente, poente e nas folhas interna da planta, cujo pico de atividade ocorreu ao meio dia (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade da redutase do nitrato (RN) em plantas de *Coffea arabica* L. cv Obatã IAC 1669-20 voltadas ao sol nascente, poente e sombreadas às 7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 h.

Períodos	07:00	12:00	17:00	22:00
Sol nascente	0,448Aab	0,916Aa	0,393Ab	0,342Ab
Sombreadas	0,190Ba	0,262Ba	0,180Ba	0,209Ba
Sol poente	0,371Aa	0,449ABa	0,340Aba	0,387Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

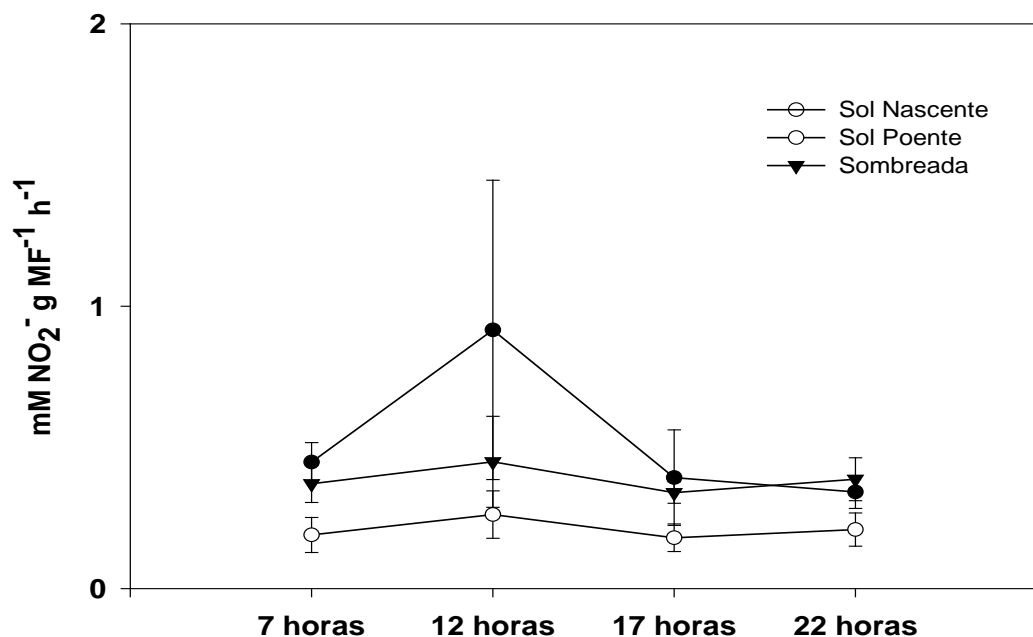


Figura 1 – Atividade da redutase do nitrato (RN) em plantas de *Coffea arabica* L. cv Obatã IAC 1669-20 voltadas ao sol nascente, poente e sombreadas às 7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 h.

Nas folhas expostas ao sol nascente, as médias obtidas para a atividade da RN às 12:00 h foi 51%, 57% e 69% superiores às médias obtidas às 7:00 h, 17:00 e 22:00, respectivamente (Figura 1). Para as folhas expostas ao sol poente, as médias obtidas para a atividade da RN às 12:00 h foram 17%, 24% e 14% superiores às médias obtidas às 7:00 h, 17:00 e 22:00 horas, respectivamente. A baixa atividade da enzima nessas folhas pode ser explicada por danos visíveis no tecido foliar, provocado pela saturação do aparelho fotossintético. Por sua vez, as folhas sombreadas apresentaram as menores atividades da RN, embora tenham apresentado o mesmo padrão, com os maiores valores ao meio-dia. As médias obtidas para a atividade da RN às 12:00 h ( $0,262 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) foram 27%, 31% e 20% superiores às médias obtidas às 7:00 h ( $0,190 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ), 17:00 ( $0,180 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) e 22:00 ( $0,209 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ), respectivamente.

Os resultados obtidos no presente experimento não corroboram os resultados que tem sido obtidos para mudas de cafeeiro. Diversos autores verificaram que, em folhas de cafeeiro jovem, a atividade da enzima RN é maior no período noturno, decrescendo ao longo do período luminoso (Cordeiro *et al.*, 1984; Alves *et al.*, 1985 e Queiroz *et al.*, 1993). Faleiros *et al.* (1975) estudaram o efeito da adubação nitrogenada e o desenvolvimento das mudas de café sob 50% de luz e a pleno sol e constataram que nas plantas sombreadas parcialmente (50% de luz) a atividade da RN foi mais elevada. Cordeiro *et al.* (1984) estudaram a atividade da enzima em plantas jovens de cacau e de café (*Coffea arabica* L.) na luz e no escuro. Os autores verificaram que essas plantas apresentaram maior atividade da RN em ambiente escuro, comparativamente aos resultados obtidos nas plantas iluminadas. Resultado semelhante foi encontrado por Carelli (1987) que constatou decréscimo na atividade da RN durante a fase clara e aumento no período de escuro. Na pesquisa com plantas jovens de café submetidas a diferentes quantidades de luz e de nitrogênio Carelli *et al.* (1990) observaram que as plantas cultivadas a pleno sol apresentaram menor atividade dessa enzima em relação às plantas sombreadas, embora possuíssem teores elevados de açúcares totais (fonte de energia) e de nitrato (substrato).

No presente trabalho verificou-se a atividade da enzima em folhas sombreadas e às 22:00 horas, embora fosse esperado que a mesma seria inativa, por falta de luz para ativar a RN (Carelli *et al.*, 1990; Queiroz *et al.*, 1993).

Tabela 2 – Quantidade de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenóides em plantas de *Coffea arabica* L. cv Obatã IAC 1669-20 voltadas ao sol nascente, poente e sombreadas.

Períodos	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenóides
Sol nascente	0,171a	0,074a	0,256a	15,905a
Sombreadas	0,130b	0,058b	0,211b	13,072b
Sol poente	0,090c	0,053b	0,179b	10,815c

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

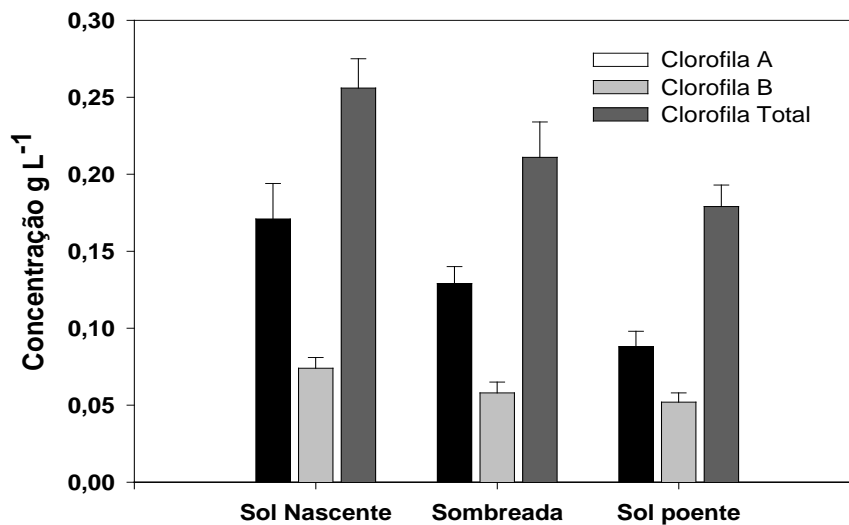


Figura 2 – Quantidade de Clorofila *a*, Clorofila *b* e Clorofila total em plantas de *Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20 voltadas ao sol nascente, poente e sombreadas

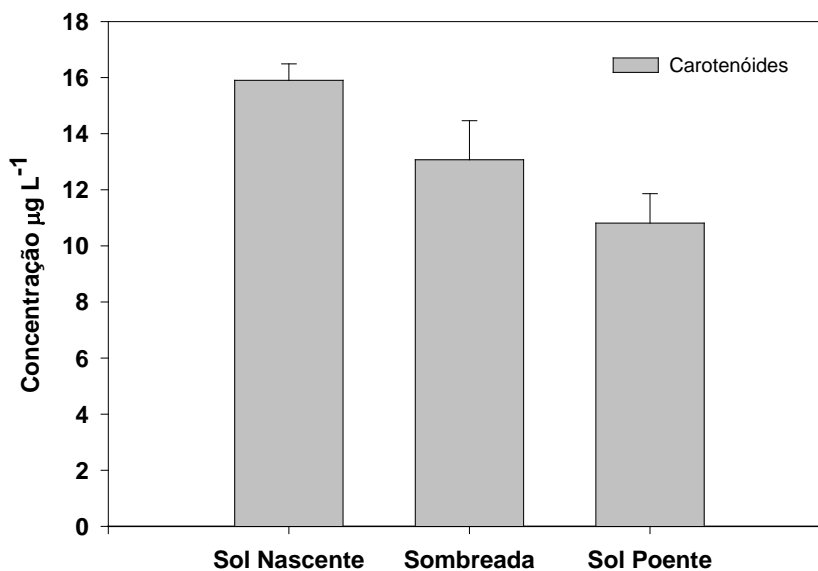


Figura 3 – Quantidade de carotenóides em plantas de *Coffea arabica* L. cv Obatã IAC 1669-20 voltadas ao sol nascente, poente e sombreadas.

Ao comparar os dados obtidos para folhas que recebem sol nascente com folhas sombreadas verificou-se maior quantidade de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides, embora nas folhas sombreadas também tenha sido constatado altos teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides. As folhas que recebem sol poente apresentaram saturação do aparelho fotossintético com danos visíveis no tecido foliar. Em razão disso, seus teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides

foram menores. A menor quantidade de carotenóides nas folhas sob sombreamento é corroborada por Gonçalves (2007). Este aumento na quantidade de carotenóides nas plantas crescendo a pleno sol pode ser explicado, principalmente, pelo efeito protetor das xantofilas (fotoproteção) contra o aumento nos níveis de radiação observados no período. Segundo Foyer *et al.*, (2001), os carotenóides (xantofilas, zeaxantina e luteína) transformam a 1Chl (clorofila excitada) em clorofila e 3Chl e 1O<sub>2</sub> em Chl (clorofila no estado normal) e O<sub>2</sub>, com produção de calor. Portanto, atua como um mecanismo que protege o aparato fotossintético do excesso de calor. O aumento dos teores de carotenóides foliar garante maior eficiência de funcionamento do aparato fotossintético e protege contra a fotoinibição. Sob condições de alta irradiância, como é o caso do cafeeiro a pleno sol, mudanças qualitativas devem acontecer na planta, incluindo uma diminuição de pigmentos coletores de luz, os quais reduzem a absorção lumínica e diminui a pressão energética sobre os fotossistemas (NUNES *et al.*, 1993; RAMALHO *et al.*, 2000).

## CONCLUSÕES

A atividade da redutase do nitrato foi maior em folhas expostas ao sol nascente, bem como o teor de clorofila A, B, total e carotenóides, enquanto as folhas sombreadas apresentaram os menores valores para essas variáveis. As menores atividades da RN e dos pigmentos foram observadas nas folhas expostas ao sol poente.

Em todas as exposições luminosas foi determinada maior atividade da RN às 12:00 h e os menores valores ocorreram às 22:00 h.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE NETTO, J.F. Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica. 2005. 60 p. Dissertação. Mestrado. ESALQ/USP. Piracicaba, 2005.
- ALVES, J.D.; CORDEIRO, A.T.; RENA, A.B. Relações entre fotossíntese, resistência difusiva e variação circadiana da redutase do nitrato em *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 12., Caxambu, 1985. **Anais**. Rio de Janeiro: MMIC/IBC, 1985. p.142-145.
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.20, p.495-522, 1969.
- CARELLI, M.L.C. Estudo do processo de redução de nitrato durante o desenvolvimento inicial e no estágio reprodutivo de plantas de café (*Coffea arabica* L.). Campinas, Universidade Estadual de Campinas. PhD thesis. 1987.
- CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.L.; MAGALHÃES, A.C. Redução de nitrato em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de luz e de nitrogênio. **Bragantia**, v.49, n.1, p.1-9, 1990.
- CORDEIRO AT, RENA AB, MENDES LF, ALVES JD, PEREIRA AA. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens e adultas de *Coffea arabica* L., à luz e na obscuridade. In: Annals of the 11<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Londrina, Brasil, pp.77-79, 1984.
- CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T. et al. Nitrogen and sulfur In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. Cap. 16, p. 786-849.
- DAMATTA, F.M.; MAESTRI, M. Photo inhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **Photosynthetica**, v.34, p.439-446. 1997. 1999
- Da MATTA, F.M. Ecophysiological constraints on the production of shade and unshade coffee: A Review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 86, p. 99-114, 2004.
- EVANS, J.R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78:9-19. 1989
- FAHL J.I.; CARELLI M.L.C; VEGA J., MAGALHÃES A.C. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). *J. Hort. Sci.* 69:161-169. 1994
- FALEIROS, R.S.S.; MELO, W.J.; CARVALHO, F. et al. Atividade da nitrato redutase e desenvolvimento de mudas de *Coffea arabica* L. (café). **Científica**, v.3, p.277-283, 1975.
- FOYER, C.; FERRARIO-MERY, S.; NOCTOR, G. Interactions between carbon and nitrogen metabolism. In: LEA, P.J. (Ed.). **Plant nitrogen**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 343-367.
- GALANGAU, F.; DANIELE-VEDELE, F.; MOREAUX, T.; DORBE, M. F.; LEYDECKER, M.T.; CABOCHE, M. Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 383-388, 1988.
- GONÇALVES, G. C. Cultivo em campo de *Coffea arabica* L. Cv. Obatã a pleno sol x sombreamento parcial: avaliações bioquímicas, fisiológicas e nutricionais. Tese Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba-SP.
- HAGEMAN, R.H.; FLESHER, D. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. **Plant Physiology**, v.35, n.5, p.700-708, Sept. 1960.
- HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). **Plant Physiology**, v.49, p.146-154, 1972.
- HERNANDEZ, A.P.; COCK, J.H.; EL-SHARKAWY, M.A. The responses of leaf gas exchange and stomatal conductance to air humidity in shade-grow coffee, tea, and cacao plants as compared to sunflower. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, n.2, p.155-161, 1989.

- HIPKIN, C.R.; AL CHARBI, A.; ROBERTSON, K.P. Studies on nitrate reductase in British angiosperm. II- variation in nitrate reductase activity in natural populations. **New Phytologist**, v.97, p. 641-651, 1984.
- HOLLINGER, D.Y. Canopy organization and foliage photosynthetic capacity in a broadleaved evergreen montane forest. *Functional Ecology* 3: 52-62. 1989
- ISHIDA A.; TOMA, T., MARJENAH. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in relation to leaf angle, azimuth, and canopy position in the tropical pioneer tree, *Macaranga conifera*. *Tree Physiology* 19: 117-124.
- LEE, D.W.; BRAMMEIER, S.; SMITH, A.P. The selective advantages of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. **Biotropica**, Washington, v. 19, n. 1, p. 40-49, 1987.
- LEWIS, O.A.M.; WATSON, E.F.; HEWITT, E.J. Determination of nitrate reductase activity in barley leaves and roots. **Annals of Botany**, v.49, p.31-37, 1982. 1982.
- MARIN, F.R.; SANTIAGO, A.S.; RIGHI, E.Z.; SENTELHAS, P.C.; ANGELOCCI, L.R.; MAGGIOTTO, S.R.; PEZZOPANE, J.R.M. Solar radiation interception and its relation with transpiration in different coffee canopy layers. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.11, n1, p.1-6. 2003.
- MORAN, R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N,- dimethylformamide. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 1376-1381, 1982.
- NUNES, M.A.; RAMALHO, J.C., DIAS, M.A. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. *J. Exp. Bot.* 44: 893-899. 1993
- OAKS, A. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.739-750, 1994.
- PAIVA, L.C. Produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em diferentes níveis de sombreamento e seus reflexos na implantação. Lavras, 2001. 61p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal de Lavras.
- QUEIROZ, C.G.A.; ALVES, J.D.; RENA, A.B.; CORDEIRO, A.T. Efeito do cloranfenicol, propanol, pH e temperatura sobre a atividade da redutase do nitrato em cafeeiros jovens. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 14, p. 73-77, 1991.
- QUEIROZ, C.G.S.; RENA, A.B.; CORDEIRO, A.T.; ALVES, J.D. Distribuição da atividade da redutase do nitrato no cafeeiro: a importância da raiz. *Rev. bras. Bot.* 16:31-35. 1993a
- RAMALHO, J.C.; CAMPOS, P.S.; QUARTIN, V.L.; SILVA, M.J.; NUNES, M.A. High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N availability in *Coffea arabica* L. plants. *J. Plant Physiol.* 154:319-326. 1999
- RAMALHO, J.C.; PONS, T.L.; GROENEVELD, H.W.; AZINHEIRA, H.G.; NUNES, M.A. Photosynthetic acclimation of high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Aust. J. Plant Physiol.* 27:43-51. 2000
- VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T. et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **The Plant Journal**, v.3, p.313-324, 1993.
- YANEVA, I. A.; BAYDANOVA, V. D.; VUNKOVA-RADEVA, R. V. Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.495-501, 2000.