

## ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO EM FUNÇÃO DA DOSE DE NITROGÊNIO AO CAFEIEIRO

Ana Paula Neto<sup>1</sup>; José Laércio Favarin<sup>2</sup>; Tiago Tezotto<sup>1</sup>; Diogo Francisco Martins Guerreiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> M. Sc. Estudante de doutorado, ESALQ/USP, apneto@esalq.usp.br; tezzoto@esalq.usp.br

<sup>2</sup> Professor, D. Sc., ESALQ/USP, jlfavari@esalq.usp.br

<sup>3</sup> Estudante de Agronomia, ESALQ/USP, diogofmguerreiro@gmail.com

**RESUMO:** O nitrogênio contido no cafeeiro provem do solo e do fertilizante, em que mais de 50% chega às folhas na forma de nitrato, onde é convertido a nitrito, depois em amônio e, finalmente, assimilado pelas plantas como glutamina. O objetivo desta pesquisa foi quantificar a atividade da redutase do nitrato (RN) e a assimilação do nitrogênio em função da dose e do tempo decorrido de uma única aplicação do fertilizante nitrogenado, na forma de uréia. A concentração de nitrogênio e aminoácidos foliares diminuiu na fase de granação e aumentou na maturação dos frutos, em função da dose do nutriente. Houve, também, aumento na concentração de nitrato e de amônio foliar, com a dose de nitrogênio. A maior atividade da redutase do nitrato ocorreu, aproximadamente, 20 dias depois da aplicação do nitrogênio, independente da dose aplicada.

**Palavras-Chave:** *Coffea arabica* L, amônio, aminoácidos, redutase do nitrato, fertilizantes

## NITRATE REDUCTASE ACTIVITY PEAK WITH NITROGEN SUPPLY TO COFFEE PLANT

**ABSTRACT:** The nitrogen derived from the soil or supplied through fertilizer is absorbed largely in the form of nitrate, which is converted to nitrite and then in ammonium that will be assimilated by plants. The aim of this study was to assess the fluctuation of the nitrate reductase activity, as well as nitrogen assimilation after application of nitrogen fertilizer in coffee plant. It was found that nitrogen and amino acids leaf concentration increased with the supply of nitrogen fertilizer after grain formation in maturation stage. Similarly was increased nitrate and ammonium leaf concentration with nitrogen supply to coffee plant. Nitrate reductase activity peak occurred between 18 and 25 days after nitrogen fertilizer application.

**Key words:** nitrate, ammonium, amino acids, nitrate reductase, fertilizers

## INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pelo cafeeiro. Este nutriente participa da síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, as quais são responsáveis pela síntese de outras proteínas e dos intermediários metabólicos e componentes da estrutura celular, como carboidratos, lipídios e pigmentos. Estes compostos constituem a estrutura da planta e são requeridos para o crescimento celular e dos órgãos, como os frutos (Lemaire et al., 1992; Lawlor, 1995).

Para ajustar a dose e época de aplicação do fertilizante à demanda da planta são realizados estudos de curva de resposta a doses de N, aplicados em diferentes fases. No entanto, estes estudos são prejudicados pela adição de N no sistema por meio das chuvas e também da própria reserva do solo, que podem afetar a resposta da planta a adubação nitrogenada. Da mesma forma, as perdas por lixiviação e as emissões gasosas tanto dos solos quanto das plantas comprometem as interpretações em relação a esse nutriente. Além disso, as respostas podem ser diferenciadas em razão das condições de cultivo, variedade, região, clima e ano agrícola. Portanto, para aumentar a eficiência no uso do N é necessário desenvolver e aprimorar modelos de simulação baseados nas relações empíricas, pela incorporação de informações bioquímicas (Lawlor, 2002).

O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são as principais formas de N inorgânico absorvido pelas raízes das plantas superiores. No entanto, para cumprir sua função nutricional o  $\text{NO}_3^-$  precisa ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$  e assimilado em compostos orgânicos. A assimilação do nitrato a amônio é mediada por duas enzimas: (i) a redutase do nitrato (RN), que transforma nitrato em nitrito, processo que ocorre no citosol das células; e (ii) a redutase do nitrito (NiR) que transforma nitrito a amônio, nos plastídeos das células. Com a formação do amônio, o N é incorporado em aminoácidos pela atividade do complexo de enzimas GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase) (Marschner, 1995).

A ação da RN é o passo limitante da assimilação do nitrato e, conseqüentemente, afeta o desenvolvimento e a produção das proteínas vegetais, e pode ser usado para estimar a capacidade de assimilação de N (Beevers e Hageman, 1980; Oaks, 1994). A atividade da RN é regulada por inúmeros fatores, como síntese e degradação de enzimas, inativação reversível e concentração do substrato (Solomonson e Barker, 1990), além de fatores externos como a luz, o teor de água na planta, a temperatura atmosférica e a umidade do solo. A atividade da RN pode ser induzida em poucas horas após a aplicação do N, conforme a fonte utilizada, assim como ser suprimida por alguns aminoácidos (Oaks,

1991; Oaks et al., 1972; Breteler e Smit, 1974). Segundo Silvasankar e Oaks (1996), o nitrato, a luz e a concentração de carboidrato atuam na transcrição e tradução da RN. Para a assimilação de amônio há uma alta demanda por cadeias carbônicas, gerando competição entre a síntese de sacarose e aminoácidos (Hucklesby e Blanke, 1992). Além disso, as condições ambientais relacionada ao regime hídrico e ao conteúdo de água na planta e no solo podem provocar alterações na capacidade de assimilação de nitrato.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a flutuação da atividade da enzima redutase do nitrato, bem como a assimilação do nitrogênio, em função da dose e tempo da aplicação do fertilizante nitrogenado.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido de fevereiro a julho, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, município de Piracicaba – SP, situada a 22°42'30" de latitude Sul e 47°38'00" de longitude Oeste e 580 m de altitude. De acordo com a classificação de Köppen o clima regional é do tipo Cwa, tropical de altitude com inverno seco, temperatura média anual de 22° C e precipitação pluviométrica média de 1.280 mm anuais distribuídos durante o ano, com maior concentração de novembro a março (Figura 1). O solo da área experimental é classificado como Nitossolo Vermelho, Eutroférico, latossólico, textura argilosa. Os dados da análise do solo são:  $pH_{(CaCl_2)} = 5,1$ ;  $MO = 38 \text{ g dm}^{-3}$ ;  $P(\text{resina}) = 74 \text{ mg dm}^{-3}$ ;  $K = 5,2 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $Ca = 72 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $Mg = 25 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $H + Al = 40 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $SB = 101,9 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $CTC = 142,2 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $V = 71\%$ . Nesta pesquisa foram utilizadas plantas da espécie *Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20, com sete anos, no espaçamento 3,4 x 0,9 m.

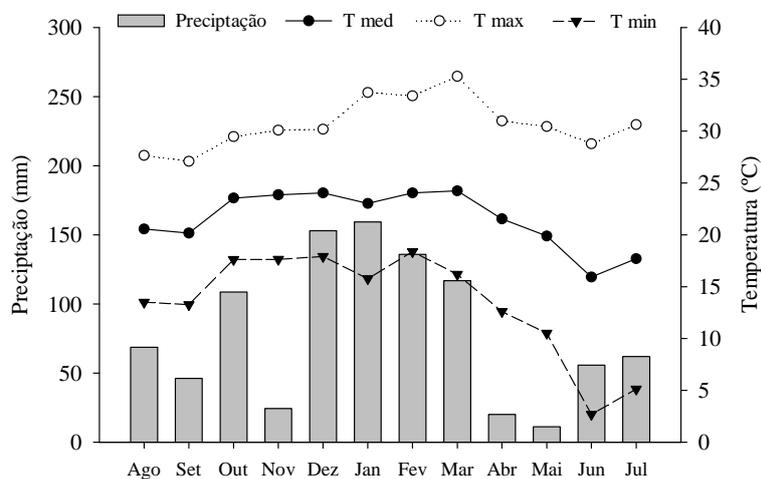


Figura 1 – Precipitação (mm) e temperatura média, máxima e mínima (°C) da área experimental da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP, no período de agosto a julho

Os tratamentos utilizados foram:  $T_0$  - sem adubação nitrogenada;  $T_1$  -  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ , que equivale a  $61 \text{ g planta}^{-1}$  de N ( $136 \text{ g planta}^{-1}$  de uréia);  $T_2$  -  $800 \text{ kg ha}^{-1}$ . O experimento foi implantado em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições, em esquema de parcelas subdivididas no tempo. O nitrogênio foi aplicado na forma de uréia em uma única aplicação. Cada parcela foi constituída de 7 plantas, das quais 5 foram avaliadas.

A aplicação da uréia nas parcelas foi realizada em uma única adubação em fevereiro, com as amostragens efetuadas de março a junho, num total de cinco coletas: 4 dias após a adubação (DAA), 18 DAA, 49 DAA, 91 DAA e 138 DAA.

Para avaliação da atividade da enzima RN foram realizadas coletas com 1, 4, 18, 55, 91 e 138 dias após a adubação (DAA) com o objetivo de verificar a flutuação da atividade da RN após a aplicação do N. A atividade da redutase do nitrato foi determinada segundo o ensaio *in vivo* modificado por Radin (1974). Foram coletadas amostras de terceiros pares de folhas às 9 h.

As concentrações de N-total,  $N-NO_3^-$  e  $N-NH_4^+$  foram determinados para auxiliar na compreensão dos resultados bioquímicos. Para determinação do N-total o material foi submetido à digestão sulfúrica (Jackson, 1958) e determinado de acordo com o método analítico semi-micro Kjeldahl (Bremner, 1965). Para determinação das concentrações de amônio e nitrato nos tecidos utilizou-se a metodologia relatada por Tedesco *et al.* (1985), e as determinações de amônio e nitrato extraídos foram feitos por destilação a vapor (Bremner e Edwards, 1965), com o destilador modificado conforme descrito por Tedesco e Gianello (1979). O procedimento para extração e quantificação de aminoácidos foi baseado na técnica de Bielecky e Turner (1986).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas no tempo. Os dados foram submetidos às análises estatísticas utilizando o programa estatístico SAS – System for Windows 9.1 (SAS, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na referida pesquisa verificou interação significativa entre dose de nitrogênio (N) e tempo após a adubação nitrogenada para a concentração de N foliar, aminoácidos totais solúveis, concentração de nitrato e amônio. Para a atividade da redutase do nitrato constatou-se significância para a dose de N fornecida.

Na primeira avaliação, aos 4 dias após a adubação, o cafeeiro na fase de granação, apresentou concentração média de  $24,2 \text{ g kg}^{-1}$  de N (Figura 2), inferior à classe adequada ( $29 \text{ a } 32 \text{ g kg}^{-1}$ ) (Malavolta, 2006), devido a demanda dos frutos para atender uma produção da ordem de 60 sacas por hectare. Com a aplicação de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de N observou aumento na concentração de N foliar até os 49 dias após a adubação, mesmo na fase de granação, época de intensa remobilização de N, em que a concentração de N total variou de  $24,2 \text{ g kg}^{-1}$  aos 4 dias para  $25,5 \text{ g kg}^{-1}$  aos 49 dias após a adubação. O aumento de N total foi atribuído ao acúmulo de nitrato foliar, cuja concentração variou de  $63,8$  para  $145 \text{ mg kg}^{-1}$ , sem variação para o amônio, que passou de  $72,4 \text{ mg kg}^{-1}$  para  $74,4 \text{ mg kg}^{-1}$  aos 49 dias da adubação (Figura 3). A aplicação de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de N foi suficiente para atender a demanda dos frutos e elevar a concentração foliar, como indica o acúmulo de N foliar (Figura 2).

A aplicação de  $800 \text{ kg ha}^{-1}$  de N resultou numa redução da concentração do N total de  $23,6 \text{ g kg}^{-1}$  aos 4 dias da adubação para  $21,8 \text{ g kg}^{-1}$  aos 49 dias, embora tenha havido acúmulo de nitrato nas folhas, o que ocorreu em menor proporção quando comparado a aplicação de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ . A aplicação de  $800 \text{ kg ha}^{-1}$  de N pode consumir maior quantidade de carboidrato para a assimilação nas raízes, o que explicaria a menor concentração de N total presente na folha de N (Figura 2).

Aos 91 dias, com o término da fase de granação, observa-se uma retomada do aumento da concentração de N foliar com o fornecimento de N, atingindo concentrações foliares de  $27,1 \text{ g kg}^{-1}$  de N e  $25,1 \text{ g kg}^{-1}$  de N, para o fornecimento de  $200$  e  $800 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, respectivamente. Isso se deu devido à absorção radicular e/ou remobilização de órgãos de reserva, como raízes, ramos e folhas velhas (Lima Neto e Malavolta, 2003). O mesmo ocorreu para a concentração de aminoácidos, cuja concentração na fase de maturação foi  $1,08 \text{ mg g}^{-1}$  de MS pelo fornecimento de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de N; e na dose de  $800 \text{ kg ha}^{-1}$  de N obteve valor igual a  $1,39 \text{ mg g}^{-1}$  de MS. A elevação nas concentrações de aminoácidos, uma das formas de translocação de N, se deve a ausência de demanda pelos frutos, já que estavam na fase de maturação.

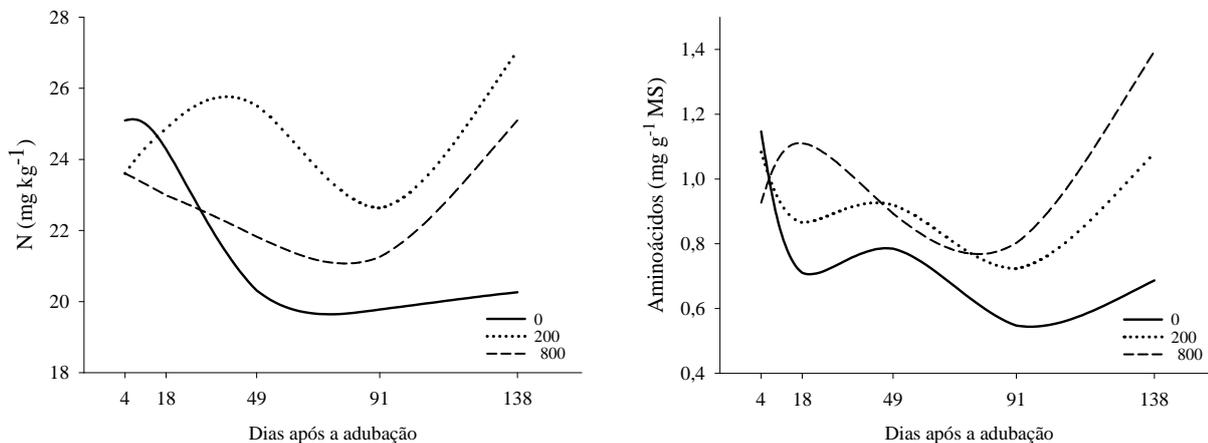


Figura 2 – Concentração de N e aminoácidos em folhas de cafeeiro em função do tempo decorrido após a adubação nitrogenada em cada dose de N

A concentração de  $\text{NO}_3^-$  foliar variou no período em que as coletas foram realizadas. Como o nitrato é a forma de N mais absorvida e armazenada nas plantas, observa-se um aumento da concentração de nitrato a partir de 18 dias após o fornecimento das doses de N (Figura 3). Para a dose de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ , observa-se aumento na concentração de nitrato até os 91 dias após a adubação. Já para o fornecimento de  $800 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, verifica-se um aumento na concentração de nitrato foliar até os 49 dias após a aplicação, com redução da concentração de nitrato foliar nos próximos 40 dias. Essa redução, quando comparada ao fornecimento de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ , provavelmente, se deve ao intenso consumo de carboidratos nas raízes para a assimilação desta dose de N. A partir desta fase observa-se um novo aumento na concentração de nitrato foliar. Observa-se ainda, nas plantas que receberam  $800 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, uma menor

concentração de amônio nas folhas, o que indica um mecanismo de defesa da própria planta contra a assimilação em excesso de formas amoniacais de N, o que é tóxico para as plantas.

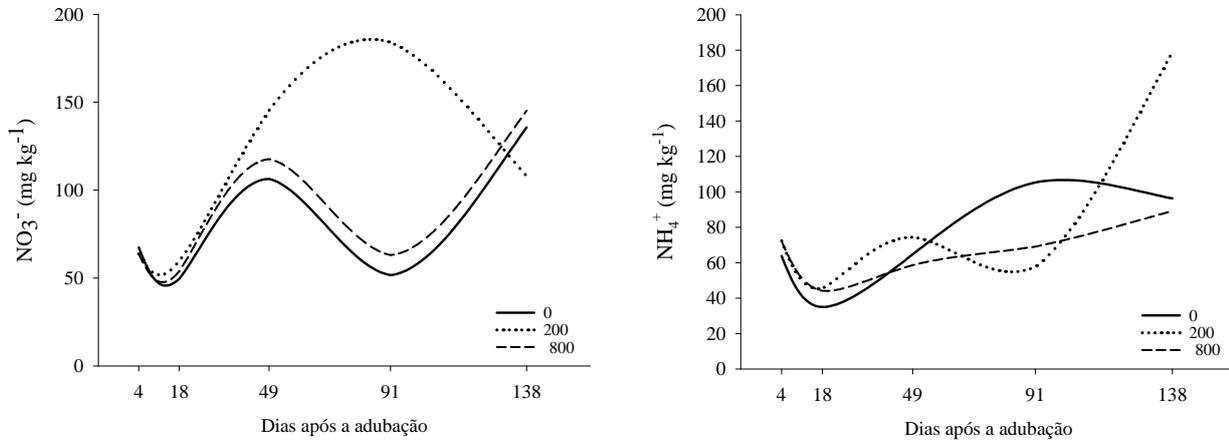


Figura 3 – Concentração de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em folhas de cafeeiro em função do tempo decorrido após a adubação nitrogenada em cada dose de N

A redutase do nitrato aumentou a partir do quarto dia da aplicação da uréia (Figura 4), à medida que aumentava a concentração de nitrato foliar, substrato da referida enzima (Figura 3). A maior atividade da RN ocorreu por volta de 20 dias após a adubação, independente da dose de N.

Na média das três doses de N (sem N, 200 e 800 kg ha<sup>-1</sup> de N) o pico da atividade da enzima ocorreu em época com elevada precipitação (116,8 mm) e maiores temperaturas (Figura 1). A partir desse período a temperatura começa a cair e há redução da precipitação, o que pode explicar a queda da atividade da RN. No final da granação e início da maturação verificou uma tendência de aumento da atividade da RN, independente da dose de N aplicada. Do exposto, pode-se afirmar que tanto a precipitação, quanto a temperatura mínima são fatores ambientais que atuam na regulação da atividade desta enzima, corroborando as observações de Taleisnik et al. (1980).

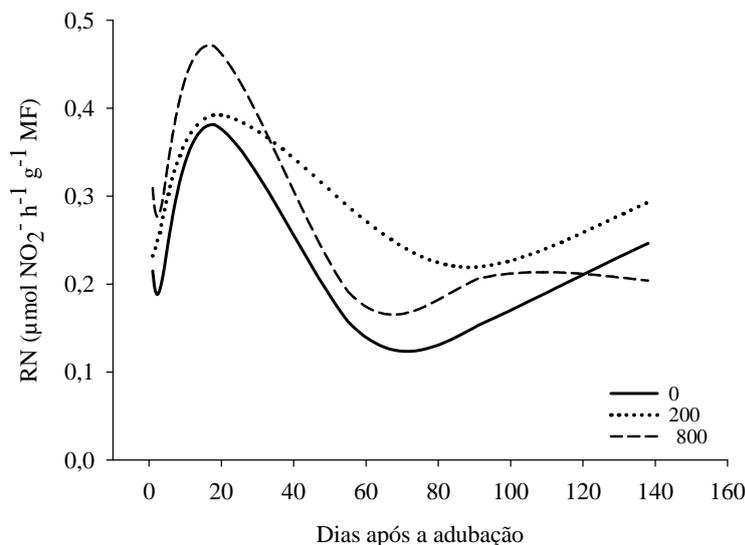


Figura 4 – Atividade da enzima redutase do nitrato em folhas de cafeeiro em função do tempo decorrido após a adubação nitrogenada em cada dose de N

## CONCLUSÕES

A concentração N e de aminoácidos foliares diminui na fase de granação e aumenta na maturação dos frutos, em função da dose do nutriente.

As concentrações de nitrato e amônio foliares aumentam com a dose de nitrogênio.

A maior atividade da redutase do nitrato ocorre aos 20 dias após a aplicação do nitrogênio, independente da dose do nutriente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate and nitrite reduction. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Ed.). **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1980. p. 115-168.
- BIELESKY, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of aminoacid in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 17, p. 278-293, 1966.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p. 1149-1178.
- BREMNER, J.M.; EDWARDS, H.L. Determination and isotope ratio analysis of differents forms of nitrogen in soils. I. Aparatus and procedures for destillation and determination for ammonium. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 29, n. 1, p. 504-507, 1965.
- BRETELER, H.; SMITH, A.L. Effect of ammonium nutrition on uptake and metabolism of nitrate in wheat. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, Wageningen, v. 22, p. 73-78, 1974.
- HUCKLESBY, D.P.; BLANKE, M.M. Limitation of nitrogen assimilation in plants. IV. Effect of defruiting on nitrate assimilation, transpiration and photosynthesis in tomato leaf. **Gartenbauwissenschaft**, v. 57, p. 53-56, 1992.
- LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 773-787, 2002.
- LAWLOR, D.W. Photosynthesis, productivity and environment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 1449-1461, 1995.
- LEMAIRE, G.; KHAITY, M; ONILLON, B.; ALLIRAND, J.M.; CHARTIER, M.; GOSSE, G. Dynamics of accumulation and partitioning of N in leaves, stems and roots of Lucerne (*Medicago sativa*) in a dense canopy. **Annals of Botany**, Oxford, v. 70, p. 429-435, 1992.
- LIMA FILHO, O.F.; MALAVOLTA, E. Studies on the mineral nutrition of the coffee plant (*Coffea arabica* L.) cv. Catuaí Vermelho). LXIV. Remobilization na reutilization on nitrogen and potassium by normal and deficient plants. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, SP, v.63, n.3, p.81-490, 2003.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 2006. 638 p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- OAKS, A. Nitrogen assimilation in roots: a re-evaluation. **BioScience**, Washington, v. 42, p. 103-111, 1991.
- OAKS, A. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 72, p. 739-750, 1994.
- OAKS, A.; WALLACE, W.; STEVENS, D. Synthesis and turnover of nitrate reductase in corn roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 50, p. 649-654, 1972.
- RADIN, J.W. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 53, p. 458-463, 1974.
- SAS. SAS/STAT user's guide, version 6.11, 4<sup>nd</sup> ed. Cary, North Carolina: Statistical Analysis System Institute. 1996.
- SILVASANKAR, S; OAKS, A. Nitrate assimilation in higher plants – the effect of metabolites and light. **Plant Physiology Biochem** v. 34, p. 609-620, 1996.
- SOLOMONSON, L.P.; BRAKER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 225-253, 1990.
- TALEISNIK, E.; BRICEÑO, J.A.; CARVAJAL, J.F. Variación estacional de la reductasa de nitrato em el cafeto. **Turrialba**, San Jose, v. 30, p. 330-337, 1980.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C. Conjunto modulado em vidro para destilação a vapor de amônia pelo método Kjeldahl. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 3, p. 61-63. 1979.
- TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1985. 95 p. (Boletim Técnico, 5).