

I. FISILOGIA DE PLANTAS

REDUÇÃO DE NITRATO EM PLANTAS JOVENS DE CAFÉ CULTIVADAS EM DIFERENTES NÍVEIS DE LUZ E DE NITROGÊNIO (1)

MARIA LUIZA CARVALHO CARELLI (2,4), JOEL IRINEU FAHL (2,4)
e ANTONIO CELSO MAGALHÃES (3)

RESUMO

Foi estudado o efeito de níveis de luz e de nitrogênio na atividade da enzima redutase de nitrato e nos teores de nitrato e de açúcares nas folhas de plantas jovens de café (*Coffea arabica* L.), assim como as possíveis relações entre a disponibilidade desses compostos e a atividade enzimática. Foram utilizadas plantas de dez meses de idade cultivadas em vasos contendo uma mistura de terra mais composto, e mantidas em condições ambientais em pleno sol e em 50% da luz solar. Metade das plantas de cada tratamento de luz foi suplementada semanalmente com nitrogênio. Os resultados mostraram que a atividade da redutase de nitrato, nos dois tratamentos de luz, foi maior nas plantas suplementadas com nitrogênio. Para um mesmo nível de nitrogênio, as plantas cultivadas em pleno sol apresentaram menor atividade da redutase de nitrato, maiores teores de nitrato e de açúcares e maiores taxas de transpiração, do que as cultivadas na sombra. Tais resultados indicam que a menor atividade da redutase de nitrato nas plantas cultivadas em pleno sol aparentemente não foi devida a limitações na disponibilidade de nitrato e de açúcares para fornecer a energia necessária para a redução de nitrato.

Termos de indexação: *Coffea arabica* L., redutase de nitrato, luz, nitrogênio, açúcares.

ABSTRACT

NITRATE REDUCTION IN YOUNG COFFEE TREES GROWN UNDER DIFFERENT LEVELS OF LIGHT AND NITROGEN

The effect of levels of light and nitrogen on the activity of the enzyme nitrate reductase and its relationship with the availability of sugars and

(1) Trabalho apresentado na II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal, realizada em Piracicaba (SP), em 20-24 de fevereiro de 1989. Recebido para publicação em 14 de agosto e aceito em 5 de dezembro de 1989.

(2) Seção de Fisiologia, Instituto Agrônomo de Campinas, Caixa Postal 28, 13001 Campinas (SP).

(3) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, 13081 Campinas (SP).

(4) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

nitrate was studied in leaves of coffee plants (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí). Ten month old plants were grown on pots containing a mixture of soil and compost, and were kept at full or 50% sunlight. Half of the plants of each light treatment received nitrogen supply. The results showed that the activity of nitrate reductase was higher on plants supplied with nitrogen at both light treatments. For the same nitrogen level, plants grown under full sunlight presented lower nitrate reductase activity, higher nitrate and sugars concentrations, and higher transpiration rates than plants kept at 50% sunlight. These results indicate that the lower nitrate reductase activity of plants grown under full sunlight was apparently not due to limitations of available nitrate and sugars to supply the energy necessary for nitrate reduction.

Index terms: *Coffea arabica* L., nitrate reductase, light, nitrogen, sugars.

1. INTRODUÇÃO

A luz e o nitrato são importantes fatores na indução e manutenção da atividade da enzima redutase de nitrato em tecidos vegetais. A redutase de nitrato é uma enzima induzível pelo substrato (HAGEMAN & FLESHER, 1960; BEEVERS & HAGEMAN, 1969), e acredita-se que a taxa de influxo de nitrato para o sítio de indução seja um dos principais fatores no controle do nível da enzima nos tecidos (JACKSON et al., 1973; NEYRA & HAGEMAN, 1975).

Uma das linhas de evidência sugere que o papel da luz na indução da atividade da redutase de nitrato está relacionado diretamente com a fotossíntese ou com a produção de carboidratos para fornecer a energia necessária ao processo de redução de nitrato (SRIVASTAVA, 1980). Outra linha de evidência sugere que o efeito da luz na atividade da redutase de nitrato seria através da modulação da disponibilidade de nitrato para a enzima. Desse modo, a luz aumentaria a absorção pelas raízes (BEEVERS et al., 1965) e o fluxo de nitrato para as folhas via corrente transpiratória (SHANER & BOYER, 1976), e também a permeabilidade de membrana, possibilitando o movimento de nitrato do vacúolo para o sítio de ação da enzima localizada no citoplasma (JONES & SHEARD, 1975; ASLAM et al., 1976).

Vários autores demonstraram que a atividade da redutase de nitrato, nas folhas de numerosas espécies, apresenta flutuações diárias, com um pico máximo ao redor do meio-dia, mas, de modo geral, aumenta durante as horas de luz e decresce no escuro (HARPER & HAGEMAN, 1972; NICHOLAS et al., 1976; LEWIS et al., 1982; LILO, 1983, 1984; HIPKIN et al., 1984). Em folhas de plantas de café, ocorre exatamente o contrário. A atividade da redutase de nitrato decresce durante as horas de luz e aumenta no escuro (CARELLI, 1987). As razões desse comportamento atípico ainda não foram determinadas.

A produção de mudas de café é feita sob telados ou ripados, ou seja, em condições sombreadas. FALEIROS et al. (1975) estudaram a nutrição nitro-

genada e o desenvolvimento de mudas de café em condições sombreadas e em pleno sol, constatando que as plantas cultivadas em 50% da luz solar apresentaram maior atividade da redutase de nitrato.

Neste trabalho, procurou-se determinar o efeito de níveis de luz e de nitrogênio na atividade da redutase de nitrato e nos teores de nitrato e açúcares nas folhas de plantas de café, assim como as possíveis relações entre a disponibilidade desses compostos e a atividade enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas – Sementes de café (*Coffea arabica* L.) cultivar Catuaí Vermelho foram germinadas em areia grossa lavada em caixas de polipropileno. Ao atingirem o estágio vegetativo correspondente à abertura das folhas cotiledonares ("orelha-de-onça"), as plântulas foram transplantadas para vasos de polipropileno contendo cerca de dois litros de uma mistura de terra mais composto, e mantidas em casa de vegetação em condições de sombreamento correspondente a 50% da luz solar, medido com um porômetro de equilíbrio dinâmico (LI-COR, modelo LI-1600), munido de um sensor quântico (LI-190-S-1). Após quatro meses do transplante, foi selecionado um lote de plantas com tamanho e desenvolvimento uniformes. Esse lote foi subdividido em quatro grupos de vinte plantas, que foram colocados sobre dois vagonetes e mantidos em condições ambientais, pondo-se sobre um deles uma tela de polipropileno com capacidade para retenção de 50% da luz solar. Metade das plantas de cada tratamento de luz passou a receber semanalmente 30ml de solução nutritiva completa (SARRUGE, 1975) mais 5mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, metade recebeu solução nutritiva sem nitrogênio (SARRUGE, 1975). Os tratamentos, portanto, foram os seguintes:

- (1) plantas cultivadas em pleno sol com suplementação nitrogenada (+ N sol);
- (2) plantas cultivadas em pleno sol sem suplementação nitrogenada (- N sol);
- (3) plantas cultivadas na sombra com suplementação nitrogenada (+ N sombra);
- (4) plantas cultivadas na sombra sem suplementação nitrogenada (- N sombra).

Quatro meses após o início dos tratamentos de luz e de nitrogênio, foram efetuadas as determinações.

Análises – A atividade da redutase de nitrato in vivo, com a adição de nitrato no meio de reação, foi analisada de acordo com o método descrito por MEGURO & MAGALHÃES (1982) e modificado por CARELLI (1987). O borbulhamento contínuo de N_2 (para manter a anaerobiose) durante o período de incubação das amostras provocou aumento médio de 30% na atividade enzimática das folhas, comparado com o controle sem N_2 . Os teores de nitrato das folhas foram determinados pelo método de GALLO & LOTT (1965) para folhas de café, utilizando-se como reagente o ácido fenoldissulfônico. Os açúcares totais e redutores foram avaliados usando-se o método de Somogyi (NELSON, 1944). O teor de sacarose foi calculado pela diferença entre os açúcares totais e os redutores.

A transpiração foi efetuada em quatro plantas de cada tratamento, utilizando-se um porômetro de equilíbrio dinâmico (LI-COR, modelo LI-1600) de acordo com processo descrito por ANGELOCCI (1983). Efetuaram-se todas as análises nas folhas recentemente expandidas, coletadas às 11 horas, à exceção das determinações dos teores de açúcares, que foram analisados durante o transcorrer do dia. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições para cada tratamento e, os dados, analisados de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Os resultados do quadro 1 mostram que, na mesma intensidade de luz, a atividade da redutase de nitrato, nas folhas das plantas suplementadas com nitrogênio, foi, em média, três vezes maior do que nas plantas não suplementadas. Para um mesmo nível de nitrogênio, a atividade enzimática nas plantas cultivadas em pleno sol foi, em média, 75% da atividade das mantidas na sombra. Tais resultados concordam com FALEIROS et al. (1975), que verificaram que a atividade da redutase de nitrato em folhas de plantas de café foi maior nas plantas cultivadas em 50% da luz solar.

O teor de nitrato nas folhas foi maior nas plantas suplementadas com nitrogênio, mas, ao contrário da atividade enzimática, foi menor nas plantas cultivadas na sombra – Quadro 1.

A taxa de transpiração das plantas cultivadas em pleno sol foi em média 87% maior do que a das plantas mantidas na sombra, e o nível de nitrogênio não alterou esse processo (Quadro 1).

QUADRO 1. Atividade da redutase de nitrato, teor de nitrato e taxa de transpiração em folhas de plantas de café de dez meses de idade, cultivadas com e sem suplementação nitrogenada, em pleno sol e a 50% da luz solar. (Média de quatro repetições)

Tratamento	Redutase de nitrato	Teor de nitrato	Transpiração
	$\mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$	$\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MF}$	$\mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$
+ N sol	1,24b	96,72d	7,69b
- N sol	0,45a	32,00b	7,17b
+ N sombra	1,60c	65,47c	4,43a
- N sombra	0,60a	19,90a	3,52a
F	152,73**	245,25**	381,93**
C.V. (%)	9,02	8,27	11,46
d.m.s. (5%)	0,19	9,70	1,44

A figura 1 mostra que, ao longo do dia, a concentração de açúcares totais, açúcares redutores e sacarose nas folhas das plantas cultivadas em pleno sol foi sempre superior às das plantas de sombra. Tais resultados são coerentes com as maiores taxas de fixação de CO_2 das plantas mantidas em pleno sol (FAHL, 1989). De modo geral, o teor de açúcares nas folhas foi mais baixo no início da manhã, atingiu o máximo entre 11 e 14 horas e declinou posteriormente.

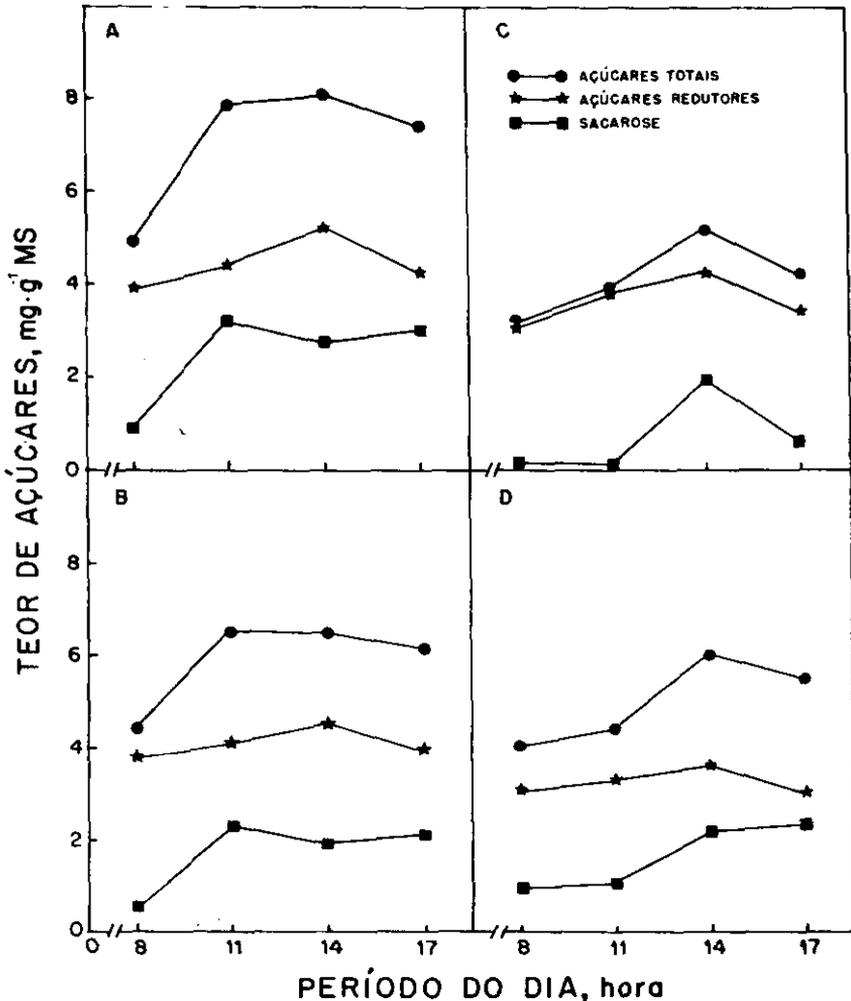


FIGURA 1. Concentrações de açúcares totais, açúcares redutores e sacarose em folhas de plantas de café de dez meses de idade cultivadas em pleno sol com (A) e sem (B) suplementação nitrogenada, e em 50% da luz solar com (C) e sem (D) suplementação nitrogenada.

No tratamento em pleno sol, as plantas que receberam suplementação nitrogenada apresentaram maiores teores de açúcares do que as que não receberam nitrogênio, ocorrendo, de modo geral, o inverso nas plantas cultivadas em 50% da luz solar.

4. DISCUSSÃO

O cafeeiro, espécie de planta de sombra não obrigatória (ALVIM, 1958), apresenta particularidades em seu metabolismo, especialmente no que se refere à assimilação de nitrogênio. Na maioria das espécies, o nitrato se acumula em condições sombreadas e os níveis de redutase de nitrato são baixos (BEEVERS & HAGEMAN, 1980). Em folhas de plantas de café já foi demonstrado que a atividade da redutase de nitrato é maior no escuro do que na luz (CARELLI, 1987).

Os dados do presente trabalho mostram que o acúmulo de nitrato nas folhas das plantas cultivadas em pleno sol foi bem maior do que nas sombreadas, enquanto a atividade da redutase de nitrato foi superior naquelas cultivadas à sombra. Tais resultados sugerem que a menor atividade da redutase de nitrato nas plantas em pleno sol pode ter sido responsável pelo acúmulo de nitrato nos tecidos. Existe uma interdependência entre a fotossíntese líquida e a absorção de nitrato: em condições não limitantes de nitrato no solo, esse processo é regulado pela quantidade de fotossintetizados translocados para as raízes (JACKSON et al., 1986). Por sua vez, o fluxo de fotoassimilados para as raízes depende da quantidade excedente da que é usada no crescimento e respiração da parte aérea (JACKSON et al., 1986). As folhas das plantas cultivadas em pleno sol apresentaram maiores reservas de açúcares e também maior taxa de fotossíntese líquida (FAHL, 1989), do que as cultivadas à sombra. Tais considerações, assim como a concentração de nitrato nas folhas e a maior taxa de transpiração, sugerem que não houve limitações na absorção e translocação de nitrato para a parte aérea nas plantas cultivadas em pleno sol.

O nucleotídeo de piridina reduzido (NADH) necessário para a redução de nitrato pode ser fornecido pelo metabolismo dos produtos da recente fixação fotossintética do CO_2 e/ou pela oxidação das reservas de carboidratos no processo respiratório (BEEVERS & HAGEMAN, 1980; ABROL et al., 1983). A menor atividade da redutase de nitrato nas plantas cultivadas em pleno sol, aparentemente, não foi devida a limitações na fotossíntese e na disponibilidade de carboidratos, pois essas plantas apresentaram maiores níveis de açúcares. Em adição, FAHL (1989) determinou a taxa de fixação de CO_2 em plantas de café cultivadas nas mesmas condições deste trabalho, e verificou que a fotossíntese foi maior nas plantas que se desenvolveram em pleno sol do que nas crescidas à sombra.

O processo de redução de nitrato ocorre tanto na luz como no escuro, embora a velocidade de redução seja maior na luz que no escuro (SILVASTAVA,

1980; CAMPBELL & SMARRELLI JR., 1986). Na luz, a principal fonte de elétrons para a redução de nitrato são as reações fotoquímicas que ocorrem nos cloroplastos. O poder redutor (NADH) produzido nos cloroplastos pode ser transferido para o citoplasma, onde está localizada a enzima redutase de nitrato, através de translocadores de dicarboxilatos (CAMPBELL & SMARRELLI JR., 1986). No escuro, a energia para a redução de nitrato seria dependente do fornecimento de NADH da atividade respiratória. A atividade da redutase de nitrato em plantas de café, ao contrário das demais espécies, é maior no escuro que na luz (CORDEIRO & RENA, 1984; CARELLI, 1987). No presente trabalho também foi confirmado que a redutase de nitrato em plantas de café apresenta um comportamento totalmente diferente das demais espécies, nas quais a atividade enzimática é menor em condições de sombreamento (SRIVASTAVA, 1980).

As considerações anteriores poderiam indicar que a redutase de nitrato em folhas de plantas de café utilizaria preferencialmente a energia gerada a partir da oxidação dos açúcares, a exemplo do que ocorre em tecidos não verdes. Desse modo, em pleno sol ocorreria menor oxidação dos carboidratos em virtude da alta relação ATP:ADP (ABROL et al., 1983) e, conseqüentemente, menor atividade da redutase de nitrato. Em condições de sombreamento, em virtude da menor energia gerada nos cloroplastos, haveria maior atividade respiratória e, portanto, maior disponibilidade de poder redutor para enzima. O menor teor de açúcares totais das plantas cultivadas em sombreamento suporta parcialmente tais considerações. A hipótese referida necessita de comprovação experimental e não exclui que outros fatores, como a presença de inibidores, possam estar interferindo no controle da redutase de nitrato em plantas de café.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite as seguintes conclusões:

1. A atividade da enzima redutase de nitrato nas folhas de plantas de café cultivadas em pleno sol foi menor do que nas plantas crescidas em 50% da luz solar.
2. A taxa de transpiração e os teores de açúcares e de nitrato foram maiores nas plantas cultivadas em pleno sol, sugerindo que não houve limitações na disponibilidade de substrato e de energia para o processo de redução de nitrato.
3. Para um mesmo nível de luz de crescimento, as plantas que receberam suplementação nitrogenada apresentaram atividade da redutase de nitrato três vezes maior do que as não suplementadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABROL, Y.P.; SAWHNEY, S.K. & NAGAI, M.S. Light and dark assimilation of nitrate in plants. *Plant, cell and environment*, **6**:595-599, 1983.
- ALVIM, P.T. Recent advances in our knowledge of coffee trees: 1. Physiology. *Coffee & Tea Industries and Flavor Field*, New York, **81**:17-25, 1958.
- ANGELOCCI, L.R. *Respostas de plantas jovens de Coffea arabica L. e Coffea canephora Pierre às variações do fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera*. Campinas, UNICAMP, 1983. 196p. Tese (Doutorado)
- ASLAM, M.; OAKS, A. & HUFFAKER, R.C. Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiology*, Lancaster, **58**:588-591, 1976.
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Nitrate and nitrite reduction. In: MIFLIN, B.J., ed. *The biochemistry of plants*. New York, Academic Press, 1980. v. 5, cap.3, p.115-168.
- & ———. Nitrate reduction in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, Cal., **20**:495-522, 1969.
- ; SCHRADER, L.E.; FLESHER, D. & HAGEMAN, R.H. The role of light in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiology*, Lancaster, **40**:691-698, 1965.
- CAMPBELL, W.H. & SMARRELLI JÚNIOR, J. Nitrate reductase: biochemistry and regulation. In: NEYRA, C.A., ed. *Biochemical basis of plant breeding: nitrogen metabolism*. Florida, CRC Press, 1986. v.2, cap.1, p.1-39.
- 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, UNICAMP, 1987. 111p. Tese (Doutorado)
- CORDEIRO, A.T. & RENA, A.B. Atividade da redutase de nitrato em plantas jovens e adultas de *Coffea arabica* L., à luz e na obscuridade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 11., Londrina, 1984. *Anais*. p.77-79.
- FAHL, J. Influência da irradiância e do nitrogênio na fotossíntese e crescimento de plantas jovens de café (*Coffea arabica* L.) Campinas, UNICAMP, 1989. 84p. Tese (Doutorado)
- FALEIROS, R.S.S.; MELO, W.J.; CARVALHO, F. & MIRANDA NETO, A.T. Atividade da nitrato redutase e desenvolvimento de mudas de *Coffea arabica* L. (café). *Cientifica*, Jaboticabal, **3**:277-283, 1975.
- GALLC, J.R. & LOTT, W.L. Método simplificado para determinação de nitrato nas folhas, com o ácido fenoldissulfônico. *Bragantia*, Campinas, **24**:III-VII, 1965. (Nota, 2)
- HAGEMAN, R.H. & FLESHER, D. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiology*, Lancaster, **35**:700-708, 1960.
- HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiology*, Lancaster, **49**:146-154, 1972.
- 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*, Oxford, **97**:641-651, 1984.

- JACKSON, W.A.; FLESHER, D. & HAGEMAN, R.H. Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings: some characteristics of apparent induction. *Plant Physiology*, Lancaster, **51**:120-127, 1973.
- ; PAN, W.L.; MOLL, R.H. & KAMPRATH, E.J. Uptake, translocation, and reduction of nitrate. In: NEYRA, C.A., ed, *Biochemical basis of plant breeding: nitrogen metabolism*. Florida, CRC Press, 1986. v.2, cap.4, p.73-108.
- JONES, R.W. & SHEARD, R.W. Phytochrome nitrate movement and induction of nitrate reductase in etiolated pea terminal buds. *Plant Physiology*, Lancaster, **55**:954-959, 1975.
- LEWIS, O.A.M.; WATSON, E.F. & HEWITT, E.J. Determination of nitrate reductase activity in barley leaves and roots. *Annals of Botany*, London, **49**:31-37, 1982.
- LILLO, C. Circadian rhythmicity in nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, **61**:219-223, 1984.
- . Diurnal variations of nitrate reductase activity and stability in barley leaves. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, **58**:184-188, 1983.
- MEGURO, N.E. & MAGALHÃES, A.C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, **17**:1725-1731, 1982.
- NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, **153**:375-380, 1944.
- NEYRA, C.A. & HAGEMAN, R.H. Nitrate uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots. *Plant Physiology*, Lancaster, **56**:692-695, 1975.
- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). I. Effects of light and temperature. *Plant Physiology*, Lancaster, **58**:731-735, 1976.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, **1**:231-233, 1975.
- SHANER, D.L. & BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiology*, Lancaster, **58**:499-504, 1976.
- SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry*, Oxford, **19**:725-733, 1980.