

# ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO DE CAFEIEIRO EM PRODUÇÃO CULTIVADO EM DIFERENTES NÍVEIS E SISTEMAS DE APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO

André R. REIS<sup>1</sup>, E-mail: andrereis99@hotmail.com , Enes FURLANI JUNIOR<sup>2</sup>, Fabiano M. BENKE<sup>1</sup>, Eusebio O. PERSEGIL<sup>1</sup>, Samuel FERRARI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aluno de graduação, FEIS/UNESP-Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira.

<sup>2</sup>Prof. Dr. Livre Docente, FEIS/UNESP-Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira.

## Resumo

A redutase do nitrato (NR) é considerada enzima chave na regulação do metabolismo do N, já que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$  antes de ser incorporado em compostos orgânicos no sistema radicular e/ou na parte aérea. Devido seu papel regulador da disponibilidade de N reduzido para o metabolismo das plantas, principalmente em solos onde o nitrato é a principal forma de N disponível, tem-se sugerido que a atividade da NR está relacionada com a produtividade e/ou sua capacidade em responder à adubação nitrogenada. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade da NR nas diferentes partes do cafeeiro em função de diferentes doses e sistemas de aplicação de nitrogênio a fim de determinar as posições adequadas para futuras amostragens do tecido. O trabalho foi desenvolvido no município de Sud Mennucci-SP, e teve como objetivo avaliar o efeito de doses e épocas de aplicação de nitrogênio sobre a redutase do nitrato e estabelecer correlações com a produtividade do cafeeiro. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial 5x3, constituído pela combinação de 5 doses de N (0, 50, 150, 250 e 350 kg ha<sup>-1</sup>) aplicados na forma de uréia, em 3 épocas de aplicação. Avaliaram-se a produtividade do cafeeiro, teor de nitrogênio foliar, além da atividade da enzima redutase do nitrato durante a fase de frutificação. A atividade da enzima correlacionou-se positivamente tanto com o teor de N foliar ( $r = 0,96$ ) quanto à produtividade de grãos ( $r = 0,89$ ), a qual se ajustou a uma função linear e quadrática, respectivamente, com as doses de N aplicadas, na qual a dose 210 kg ha<sup>-1</sup> promoveu a maior produtividade.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, Redutase do Nitrato, Nitrogênio

## Abstract

### ACTIVITY OF ENZYME NITRATE REDUCTASE OF COFFEE CROP IN PRODUCTION CULTIVATED IN DIFFERENT LEVELS AND TIMES APPLICATION OF NITROGEN

The nitrate reductase (NR) is considered the key enzyme in regulation of metabolism of N, since the nitrate absorbed by the roots it should be reduced  $\text{NH}_4^+$  before being incorporate in composed organic in the system roots and/or in the aerial part. The study was developed in Sud Mennucci county (northwest of São Paulo State - Brazil) in order to evaluate the effect of different rates and times application of nitrogen on the nitrate reductase and to establish correlations with the productivity. The experimental design was the complete randomized, in a factorial outline 5x3, constituted by combination of 5 rates (0, 50, 150, 250 and 350 kg ha<sup>-1</sup>) of nitrogen (urea) in three application times (a single application in December; two applications: splitted in November and January and three applications: splitted in November, December and January). The nitrate reductase and nitrogen leaf content were evaluated during the frutification. The nitrate reductase concentration was positively correlated with the leaf nitrogen content ( $r = 0,96$ ) and production of grains (0,89) adjustig to a quadratic model function with rates of applied N, by which the rate of 210 kg N ha<sup>-1</sup> promoted the larger productivity.

Index therms: *Coffea arabica*, Nitrate Reductase, Nitrogen

## Introdução

O nitrogênio é o nutriente mais dispendioso na prática da adubação e o único exigido em grande quantidade sobre a maioria das culturas e em especial na cultura de café. Ainda que presente em altos teores nos solos, a quantidade do N na forma mineral é geralmente baixa. No ecossistema natural há perda contínua de N, não só devido à absorção destes pelas plantas, mas também por lixiviação, volatilização e desnitrificação Peoples et al. (1995).

Em plantas de clima tropical o aproveitamento do N é também danificado pela disponibilidade de água no solo, pela baixa fertilidade do solo, pela presença de alumínio, entre outros fatores (Magalhães e Fernandes, 1990; Machado e Magalhães, 1995). O aproveitamento do N na produção, de um modo geral, pode ser verificado por componentes fisiológicos como o uso eficiente da radiação e a partição de nitrogênio por órgãos reprodutivos, assim área foliar, longevidade de folhas e o uso eficiente de luz, que podem ser aumentados pela disponibilidade de N (Muchow e Davis, 1988).

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a produção de fitomassa e a produtividade final das culturas. A rota de assimilação do nitrato em plantas superiores envolve dois estágios seqüenciais: a conversão do nitrato à amônia, mediada pela redutase do nitrato (NR), a qual reduz nitrato a nitrito, e pela nitrito redutase, que converte nitrito à amônia. A amônia é então assimilada nos aminoácidos glutamina e glutamato, os quais servem para translocar nitrogênio orgânico de fontes para drenos Lam et al. (1996).

O nitrato é a principal forma de N disponível para as plantas após calagens e adubações em plantios comerciais, mas em áreas onde o pH é naturalmente baixo ou não foi devidamente corrigido por calagem, a atividade microbiana é baixa, impedindo a conversão do amônio (a uréia é a principal fonte de N dos fertilizantes brasileiros) em nitrato permanecendo no solo como amônio. A maioria das plantas absorvem o N na forma de nitrato, sendo que a forma amoniacal tem efeito tóxico para as células Coelho et al. (1991). Lemos et al. (1999), constataram maior atividade da redutase do nitrato na raiz de seringueiras jovens quando se adicionava  $\text{NO}_3^-$  e diminuição significativa quando se adicionava  $\text{NH}_4^+$  ao meio de cultura.

A enzima redutase do nitrato (NR) é uma enzima cuja síntese e atividades são induzidas pelo substrato. É considerada enzima chave na regulação da disponibilidade de N reduzido para o metabolismo das plantas, por isso poderia sua atividade estar relacionada com a produtividade do milho ou sua capacidade de responder à adubação nitrogenada (Beevers e Hageman, 1969). Vários experimentos já foram conduzidos usando genótipos de várias origens para testar a hipótese de se utilizar à atividade dessa enzima como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de materiais mais produtivos, mais respondíveis à adubação nitrogenada ou mais eficientes no uso desse nutriente. Alguns encontraram correlações baixas: Deckhard et al. (1973). A adubação nitrogenada tem valores de recomendação para cafeeiro que variam de 50 a 450 kg de N  $\text{ha}^{-1}$  Rajj et al. (1997), sendo necessário um estudo específico para a aplicação de doses, com ou sem parcelamento, principalmente em regiões não tradicionais.

A redutase do nitrato é considerada enzima chave na regulação do metabolismo do N, já que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$  antes de ser incorporado em compostos orgânicos no sistema radicular e/ou na parte aérea. Devido seu papel regulador da disponibilidade de N reduzido para o metabolismo das plantas, principalmente em solos onde o nitrato é a principal forma de N disponível, tem-se sugerido que a atividade da NR está relacionada com a produtividade e/ou sua capacidade em responder à adubação nitrogenada (Beevers e Hageman, 1969).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da redutase do nitrato nas diferentes posições do cafeeiro, em função de doses e sistemas de aplicação de nitrogênio, a fim de determinar uma posição adequada para futuras amostragens de tecido, além de avaliar os seus possíveis efeitos sobre a produtividade do cafeeiro e nos teores de nitrogênio foliar.

## Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no município de Sud Mennucci-SP (20° 40' 57'' de latitude Sul e 50° 54' 49'' de longitude oeste), coordenado pelo Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia da UNESP, Campus de Ilha Solteira-SP. O clima da região, segundo classificação de Köppen, é do tipo Aw, definido como tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno, apresentando temperatura média anual de 24,5° C e precipitação média anual de 1.232 mm, com umidade média anual de 64,8 % Hernandez et al. (1995). O solo pertence à classe taxonômica ARGISSOLO VERMELHO AMARELO Eutrófico, conforme mapa apresentado por Oliveira et al. (1999).

Inserir Figura 19

O experimento foi desenvolvido no ano agrícola 2003/2004 em condições de campo, em uma área ocupada por Café cv. Catuaí vermelho com cinco anos de idade (plantado em dezembro do ano de 1999) no espaçamento de 3,0 m entre linhas de plantio e 1,0 m entre plantas. Foi efetuada uma adubação básica de produção com: 150 kg de  $\text{P}_2\text{O}_5$   $\text{ha}^{-1}$  e 34 kg de  $\text{K}_2\text{O}$   $\text{ha}^{-1}$  (Tabela 01) seguindo as recomendações de Rajj et al. (1997) e foram implantados os tratamentos com doses de nitrogênio e sistemas de aplicação do nutriente.

Utilizou-se o esquema fatorial 5x3, sendo o primeiro fator as doses de nitrogênio (0, 50, 150, 250 e 350 kg  $\text{ha}^{-1}$ ) aplicados na forma de uréia (45% de N) incorporada, as quais foram adotadas em função da análise foliar prévia e partindo das recomendações básicas de Rajj et al. (1997) para cafeeiro em produção em outubro de 2003 (26,80 g  $\text{kg}^{-1}$ ), o segundo fator adotado foram os sistemas de aplicação de nitrogênio, com aplicação única no mês de dezembro de 2003, duas aplicações: em novembro de 2003 e janeiro de 2004 e três aplicações: em novembro e dezembro de 2003 e janeiro de 2004, em um delineamento em blocos ao acaso com três repetições, perfazendo um total de 15 tratamentos.

A Redutase do Nitrato foi avaliada em três diferentes posições na planta, sendo ápice, terço médio e base da saia do cafeeiro. As folhas foram coletadas sempre entre 9:00 e 10:00h e essas foram acondicionadas em caixas térmicas para o transporte até o laboratório. De cada folha foram eliminadas a base e o ápice, restando a porção média, a qual foram cortadas em pedaços de cerca de 5x5mm, incubados em solução tampão fosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1M) pH 8,0, contendo  $\text{KNO}_3$  (100mM) e 3 mL de Tween 20 1%, submetidos à infiltração sob vácuo, com posterior transferência para banho Maria a 32° C, sob agitação e em ausência de luz por uma hora, por 40 minutos. Alíquotas de 0,2 mL do extrato foram adicionadas a uma solução (v:v) de N-2-naftil etilenodiamino di HCl 0,02% (m/v) + sulfanilamida 1% (m/v) em HCl 1,5N. Depois de estabilizada a reação, procedeu-se à leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro. Para o cálculo da atividade da enzima redutase

do nitrato utilizou-se o valor das leituras da absorvância a 540 nm em espectrofotômetro multiplicado por 1,5 e dividido pelo peso das folhas.

Para a produtividade do cafeeiro foram colhidas três plantas de cada parcela, sendo a produção obtida convertida em  $\text{kg ha}^{-1}$  (13%, base úmida). Os dados referentes à atividade da enzima redutase do nitrato e da produtividade de grãos foram submetidos à análise de variância convencional, com as médias de épocas comparadas pelo teste de Tukey e médias de doses avaliadas por análise de regressão, ambas a 5% de probabilidade e verificada a correlação linear entre a atividade da enzima redutase do nitrato e produtividade do cafeeiro.

## Resultados e discussão

A atividade da redutase do nitrato foi verificada em três diferentes posições (ápice, terço médio e base) do cafeeiro, para se determinar o melhor local de coleta de folhas do cafeeiro para análises laboratoriais. No dia 20/11/03 (antes da aplicação do N) determinou-se a atividades nas três diferentes posições no cafeeiro, e constatou-se efeito residual do ano agrícola anterior somente na região apical (Figura 01). Isso pode ser explicado pela presença de folhas jovens, as quais apresentam alta capacidade de síntese e são drenos fortes na redistribuição de N de outras partes da planta, conseqüentemente maior atividade da enzima redutase do nitrato.

Somente uma semana após a primeira aplicação de nitrogênio foi necessário para que as três diferentes posições na planta respondessem à adubação nitrogenada (Figura 02). Devido à presença de folhas jovens no ápice, verifica-se maior atividade da enzima redutase do nitrato em relação aos outros locais avaliados, por outro lado, a base do cafeeiro apresentou a menor atividade, isso pode ser explicado pela presença de folhas velhas, as quais apresentam baixa capacidade de síntese, além de baixo índice de radiação incidente nas folhas basais. A atividade da enzima em todos os locais avaliados se ajustaram à regressão linear, na qual a atividade aumenta com os níveis crescentes de nitrogênio.

Uma semana após a segunda aplicação (27/12/03), a atividade da enzima redutase do nitrato foi significativa somente no ápice e no terço médio do cafeeiro (Figura 03). Novamente o ápice apresentou maior atividade, ajustando à regressão quadrática, com alto valor de coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,96$ ). Por outro lado, em janeiro de 2004 (uma semana após a terceira aplicação) os três diferentes locais responderam à adubação nitrogenada, ajustando à regressão quadrática (Figura 04). Em janeiro foi o único mês que o ápice apresentou menor atividade da enzima em relação ao terço médio e a base. Além disso, em janeiro o cafeeiro apresentou a maior capacidade de atividade da enzima em relação aos outros meses avaliados chegando a aproximadamente  $1,4 \mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

A atividade da enzima redutase do nitrato se correlacionou positivamente (Figura 05) com a produtividade do cafeeiro ( $R^2 = 0,89$ ), ficando evidente a importância da atividade da enzima redutase do nitrato, pois devido seu papel regulador da disponibilidade de N reduzido para o metabolismo das plantas, principalmente em solos onde o nitrato é a principal forma de N disponível, a atividade da NR está relacionada com a produtividade e/ou sua capacidade em responder à adubação nitrogenada.

Com relação ao nitrogênio foliar realizou-se estudo de regressão polinomial, constatando-se aumento do teor de nitrogênio à medida que a dose aumentou (Figura 06). De acordo com Malavolta et al. (1997), os teores foliares de nitrogênio considerado adequado para cafeeiro variam de 29-32  $\text{g kg}^{-1}$ . A dose de 350  $\text{kg de ha}^{-1}$  proporcionou o maior teor de N foliar. Por outro lado, aplicando-se a dose de 150  $\text{kg ha}^{-1}$  a concentração de N foliar foi 33  $\text{g kg}^{-1}$ , que é considerado adequado para o estado nutricional do cafeeiro no que diz respeito a esse nutriente.

## Conclusões

A atividade da enzima redutase do nitrato responde à adubação nitrogenada, interferindo diretamente na produtividade. A atividade da NR correlaciona-se positivamente com o teor de nitrogênio nas folhas e com a produtividade do cafeeiro.

A região apical do cafeeiro superestima a atividade da enzima redutase do nitrato, enquanto a região basal mostra comportamento contrário.

O local mais adequado para a coleta de folhas de cafeeiro para análises laboratoriais de redutase do nitrato é no terço médio da planta.

A atividade da enzima redutase do nitrato é um bom parâmetro para se estimar a produtividade do cafeeiro.

A dose 350  $\text{kg de N ha}^{-1}$  proporciona maiores teores de N foliar. A dose 210  $\text{kg de N ha}^{-1}$  proporciona maior produtividade e teores ideais de N foliar.

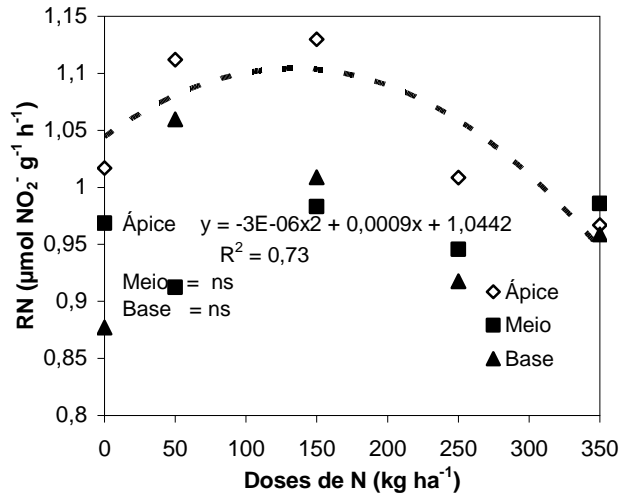


Figura 01 – Atividade da enzima Redutase do Nitrato (20/11/03) em diferentes posições no cafeeiro sob doses crescentes de N (kg ha<sup>-1</sup>)

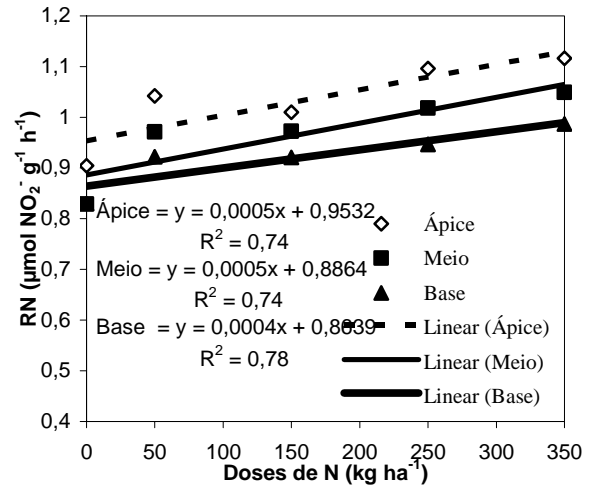


Figura 02 – Atividade da enzima Redutase do Nitrato (27/11/03) em diferentes posições no cafeeiro sob doses crescentes de N (kg ha<sup>-1</sup>)

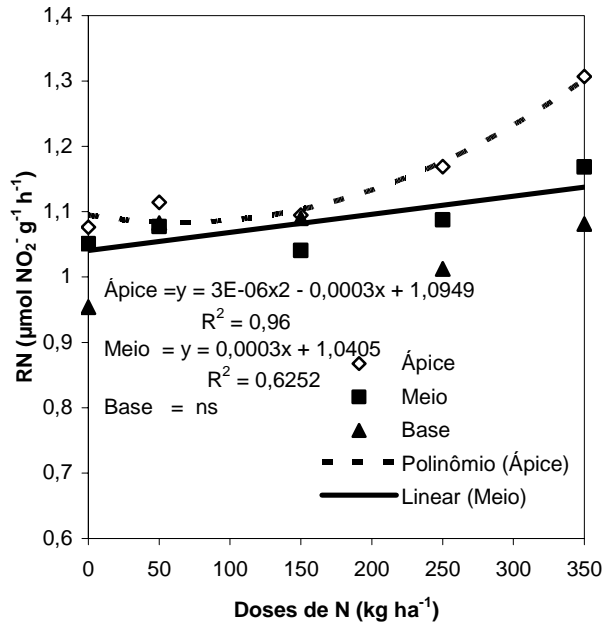


Figura 03 – Atividade da enzima Redutase do Nitrato (27/12/03) em diferentes posições no cafeeiro sob doses crescentes de N (kg ha<sup>-1</sup>)

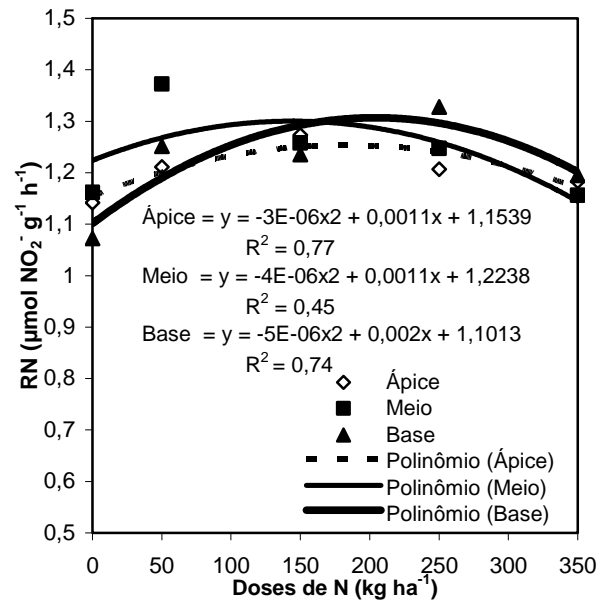


Figura 04 – Atividade da enzima Redutase do Nitrato (27/01/04) em diferentes posições no cafeeiro sob doses crescentes de N (kg ha<sup>-1</sup>)

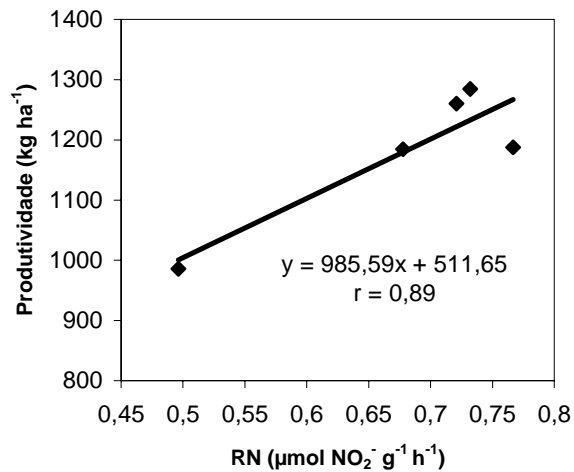


Figura 05 – Correlação entre a atividade da enzima Redutase do Nitrato e produtividade do café

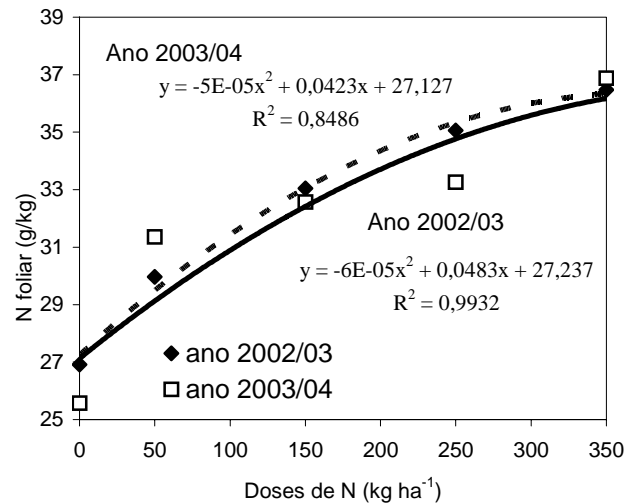


Figura 06 – Teores de nitrogênio foliar (janeiro) em café em função de doses crescentes do mesmo

## Referências

- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants, **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, 20:495-522, 1969.
- COELHO, A. M., FRANÇA, G.E., BAHIA, A. F. C. & GUEDES, G. A. A. Balanço de nitrogênio (<sup>15</sup>N) em um latossolo vermelho-escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 15:187-193, 1991.
- DECKHARD, E. L., LAMBERT, R. R. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in corn leaves as related to yields of grain and grain protein. **Crop Science**, Madison, v.13, p. 343-350, 1973.
- HERNANDEZ, F.B.T., LEMOS FILHO, M.A.F. & BUZETTI, S., Software HIDRISA e o balanço hídrico de Ilha Solteira. Ilha Solteira, UNESP/FEIS Área de Hidráulica e Irrigação, 1995. (Série Irrigação, 1).
- LAM, H.M., COSCHIGANO, K.T. & OLIVEIRA, I.C. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.569-593, 1996.
- LEMO G.B., DELU FILHO, N., OLIVEIRA, L.E.M. & PURCINO, A. A. C. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11(2):113-118, 1999.
- MAGALHÃES, J.R. & FERNANDES, M.S. 1990 In: Simpósio Brasileiro de N em Plantas. p.249-266.
- MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba : POTAFÓS, 1997. 319p
- MUCHOW, R.C. & DAVIS, R. 1988. *Field Crops Research*, 18:17-30.
- OLIVEIRA, J.B. , CAMARGO, M.N., ROSSI, M., CALDERANO FILHO, B. **Mapa pedológico do estado de São Paulo: legenda expandida**. Campinas: Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo, 1999, 64 p.
- PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F. & LADHA, J.K. 1995. *Plant and Soil*, 174:3-28.
- RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. & FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2.ed., Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1997. (Boletim Técnico n.100).