

BRUNNO CÉSAR PEREIRA ROCHA

**METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM CAFEIRO SUBMETIDO AO DÉFICIT
HÍDRICO E DOSES DE NITRATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R672m
2019

Rocha, Brunno Cesar Pereira, 1995-
Metabolismo do nitrogênio em cafeeiro submetido a déficit
hídrico e doses de nitrato / Brunno Cesar Pereira Rocha. –
Viçosa, MG, 2019.
ix, 28 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Herminia Emilia Prieto Martinez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 21-26.

1. *Coffea arabica*. 2. Déficit hídrico. 3. Nitrogênio -
Metabolismo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.
II. Título.

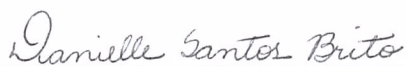
CDD 22. ed. 633.73891

BRUNNO CÉSAR PEREIRA ROCHA

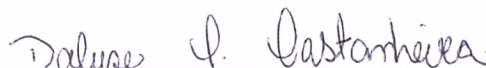
**METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM CAFEIRO SUBMETIDO A DÉFICIT
HÍDRICO E DOSES DE NITRATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

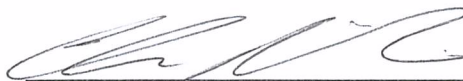
APROVADO: 04 de julho de 2019.



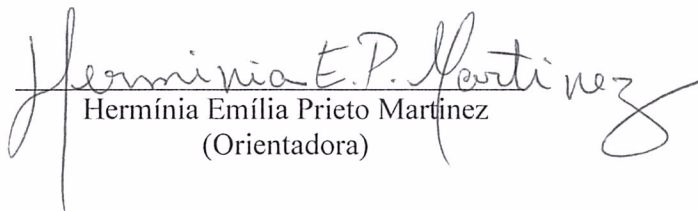
Danielle Santos Brito



Dalysse Toledo Castanheira



Cleberson Ribeiro
(Coorientador)



Hermínia Emília Prieto Martínez
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por todo o caminho que me tem conduzido.

À minha família, por todo o apoio que sempre me proporcionaram.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Fitotecnia pela estrutura e oportunidade do curso de mestrado.

À professora Hermínia Emília Prieto Martinez, pela orientação, apoio, exemplo profissional e amizade.

Aos professores Cléberon Ribeiro e Carlos Eduardo Magalhaes dos Santos pela orientação.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e aos do Laboratório de Genética de Plantas 2 pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Aos colegas da República Curtiço: Evandro, Kléver, Raphael e Denison.

E a todos que de certa forma colaboraram para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Fitotecnia.

BIOGRAFIA

BRUNNO CÉSAR PEREIRA ROCHA, filho de Antônio Carlos Rocha e Vanda Batista Pereira Rocha, nasceu em 21 de novembro de 1995 na cidade de Monte Carmelo, MG.

Em 2017, graduou-se em Agronomia na Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo.

Em agosto de 2017 ingressou no Programa de Pós-graduação em Fitotecnia em nível de mestrado, defendendo sua dissertação e obtendo o título de *Magister Scientiae* em julho de 2019.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.2. Determinação de nitrogênio total na matéria seca de folhas e raízes.....	5
2.3. Determinação da concentração de nitrato nas raízes.....	5
2.4. Preparo dos extratos para análises das atividades enzimáticas (NR e GS) ...	6
2.4.1. Determinação da atividade da redutase do nitrato (NR).....	6
2.4.2. Determinação da atividade da glutamina sintetase (GS)	6
2.5. Extração metanólica para análises de aminoácidos livres e proteínas solúveis	7
2.5.1. Determinação da concentração de aminoácidos livres	7
2.5.2. Determinação da concentração de proteína total solúvel	7
2.6. Determinação da concentração de prolina livre	8
2.7. Delineamento experimental e análise estatística	8
3. RESULTADOS	9
3.1. Atividade da nitrato redutase, glutamina sintetase e concentração de nitrato nas raízes	10
3.2. Concentração de prolina, aminoácidos e proteínas	13
4. DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
APÊNDICE A	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Umidade Relativa do ar (%) e temperaturas (°C) mínimas, máximas e médias diárias e entre março de 2017 e agosto de 2017 (Fonte: INMET).	4
Figura 2- Concentração de nitrato em raízes (A), atividade da nitrato redutase (B) e atividade da glutamina sintetase (C) em folhas de cafeeiro submetidos a doses de nitrogênio (N baixo e N alto) e diferentes potenciais hídricos, em sistema hidropônico.	11
Figura 3- Atividade da nitrato redutase (NR) foliar em quatro variedades de cafeeiros cultivadas em sistema hidropônico. Média seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.	12
Figura 4- Atividade da nitrato redutase (NR) em raízes de cafeeiro cultivadas com doses de nitrogênio (N baixo e N alto) em sistema hidropônico. Média seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.	13
Figura 5- Concentração de prolina livre em raízes (A) e de aminoácidos totais (B) em folhas de cafeeiro sob doses de nitrogênio (N baixo e N alto) em sistema hidropônico. Média seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.	14
Figura 6- Concentração de prolina livre em raízes ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) de cafeeiro nos diferentes potenciais hídricos em sistema hidropônico.	14
Figura 7- Concentração de proteínas totais solúveis (mg g^{-1} MF) em folhas de cafeeiros sob doses de nitrogênio (N baixo e N alto) em sistema hidropônico. Médias seguidas de mesmas letra maiúscula ou minúscula são iguais entre si pelos testes tukey e F de Fischer ao nível de 5% de probabilidade.	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração de nitrogênio total em folhas e raízes, nitrato em raízes, atividade da nitrato redutase (NR) e da glutamina sintetase (NR) em folhas de cafeeiros sob doses de nitrogênio (N alto e N baixo) em diferentes potenciais hídricos (MPa), em sistema hidropônico.	9
Tabela 2- Quadrados médios para concentração de nitrato (NITR), atividade da nitrato redutase (NR), glutamina sintetase (GS), concentração de aminoácidos (AAS) e concentração de proteínas (PROT).....	27
Tabela 3- Quadrados médios para concentração de nitrato redutase (NRR) e concentração de prolina (PROL), nas raízes.	28

RESUMO

ROCHA, Brunno César Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Metabolismo do nitrogênio em cafeeiro submetido a déficit hídrico e doses de nitrato.** Orientadora: Hermínia Emília Prieto Martinez. Coorientadores: Cléberon Ribeiro e Carlos Eduardo Magalhaes dos Santos.

A assimilação do nitrogênio é essencial para o crescimento e o desenvolvimento do cafeeiro, resultando em efeitos importantes sobre a fitomassa e a produtividade final da cultura. Assim, como a maioria dos nutrientes, o nitrogênio é absorvido pelas raízes utilizando a água como meio de transporte, com isso, o estresse hídrico e o nitrogênio podem afetar direta e indiretamente diversos processos fisiológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo do nitrogênio em quatro variedades de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em fase vegetativa, submetidas ao déficit hídrico e doses de nitrato. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em esquema fatorial triplo (2 x 4 x 4), em delineamento de blocos ao acaso com três repetições. As unidades experimentais receberam as combinações de duas doses: alta (7 mmol/L NO₃⁻) e baixa (2,8 mmol/L NO₃⁻) de nitrogênio, quatro potenciais hídricos (0; -0,4; -0,8; e -1,6 MPa) e quatro variedades (Mundo Novo, Acauã, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo) com idade de seis meses. Para a indução do déficit hídrico foi utilizado PEG 6000 (Polietileno glicol). Foram coletadas amostras de tecido foliar e raízes finas para determinação da atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), além da determinação da concentração de nitrato, de prolina livre, aminoácidos (AAS) e proteínas totais. O teor de nitrato, a atividade da NR e da GS, concentração de prolina em raízes, e a quantidade de aminoácidos das quatro variedades estudadas apresentaram poucas diferenças em resposta ao déficit hídrico e às doses de N. Para NR foliar, houve diferenças entre variedades que independeram do déficit hídrico e da dose de N. Com relação às doses de N, notou-se que a dose alta promoveu maior concentração de AAS e proteínas nas folhas, maior atividade da NR e concentração de prolina em raízes. Independentemente de variedade ou dose de N, o déficit hídrico promoveu um aumento na concentração de prolina nas raízes. Em plantas jovens de café submetidas à dose NB, a baixa concentração de nitrato nas raízes e a baixa atividade da NR nas folhas não se alteram com déficit hídrico crescente, enquanto que a atividade da GS mostra incrementos lineares em resposta a incrementos no déficit hídrico. Em qualquer nível de déficit as plantas com boa nutrição nitrogenada apresentam maior concentração foliar de aminoácidos solúveis e de proteínas solúveis totais. Em plantas jovens de café sob estresse hídrico a prolina participa do ajustamento osmótico, sendo sua síntese nas raízes aumentada com o aumento do déficit hídrico, e maior em plantas bem supridas com N, do que naquelas sujeitas a baixas doses

de N. As variedades Mundo Novo, Acauã, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo de modo geral não apresentaram respostas diferenciadas ao déficit hídrico.

ABSTRACT

ROCHA, Brunno César Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Nitrogen metabolism in coffee tree subjected to water deficit and nitrate doses.** Advisor: Hermínia Emília Prieto Martinez. Co-advisors: Cléberon Ribeiro and Carlos Eduardo Magalhães dos Santos.

Nitrogen uptake is essential for coffee growth and development, resulting in important effects on the biomass and final crop yield. Thus, like most nutrients, nitrogen is absorbed by the roots using water as a means of transport, so that water stress and nitrogen can directly and indirectly affect various physiological processes. The objective of this work was to evaluate nitrogen metabolism in four coffee varieties (*Coffea arabica* L.) in vegetative phase, submitted to water deficit and nitrate doses. The experiment was conducted in a greenhouse, in a triple factorial scheme (2 x 4 x 4), in a randomized block design with three replications. Experimental units received combinations of two doses: high (7 mmol / L NO₃⁻) and low (2.8 mmol / L NO₃⁻) of nitrogen, four water potentials (0; -0.4; -0.8; and -1.6 MPa) and four varieties (Mundo Novo, Acauã, Catuaí Vermelho and Catuaí Amarelo) aged six months. To induce water deficit was used PEG 6000 (Polyethylene glycol). Samples of leaf tissue and thin roots were collected to determine the activity of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) enzymes, as well as to determine the concentration of nitrate, free proline, amino acids (AAS) and total proteins. Nitrate content, NR and GS activity, root proline concentration, and amino acid content of the four varieties studied showed few differences in response to water deficit and N rates. For leaf NR, there were differences between varieties, which were independent of water deficit and N dose. Regarding N doses, it was noted that the high dose promoted higher concentration of AAS and protein in leaves, higher NR activity and proline concentration in roots. Regardless of N variety or dose, water deficit promoted an increase in proline concentration in the roots. In young NB coffee plants, low root nitrate concentration and low leaf NR activity do not change with increasing water deficit, while GS activity shows linear increases in response to water deficit increases. At any deficit level, plants with good nitrogen nutrition have higher leaf concentration of soluble amino acids and total soluble proteins. In young coffee plants under water stress proline participates in osmotic adjustment, its root synthesis being increased with increasing water deficit and higher in plants well supplied with N than in those subjected to low N doses. Mundo Novo, Acauã, Catuaí Vermelho and Catuaí Amarelo generally did not show differentiated responses to water deficit.

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural imprescindível à sobrevivência de todos os seres vivos, além de ser essencial para a absorção de nutrientes do solo pelas plantas. Porém, este recurso está se esgotando, principalmente, devido à ação antrópica nas bacias hidrográficas. A falta de água é uma das condições ambientais que mais influencia o crescimento e a produtividade das culturas. Em decorrência das recentes mudanças climáticas, períodos de déficit hídrico mais acentuados e contínuos resultam em consequências negativas ainda maiores. Assim, estudos da tolerância ao déficit hídrico pelas plantas é fundamental para a produção das culturas nessas condições (DAMATTA et al., 2010; MENEZES-SILVA et al., 2017).

Devido à preocupação com a escassez de água e a necessidade premente de economia, os agricultores defrontam-se com o desafio de utilizarem esse recurso de forma mais racional. Assim, a utilização de métodos de irrigação e de práticas de manejo que permitam maior eficiência no uso da água e menor consumo de energia são metas imprescindíveis para a cafeicultura moderna. A cafeicultura é uma das principais atividades agrícolas do Brasil, com importância nos aspectos socioeconômicos e no agronegócio (KOBAYASHI, 2007).

No contexto mundial, o café é um dos produtos agrícolas de maior relevância, sendo o segundo maior gerador de divisas, ficando atrás somente do petróleo. No Brasil, a cultura do café foi introduzida em regiões de fácil adaptação, como a região sudeste, devido à boa disponibilidade hídrica. Posteriormente, foi expandindo-se para regiões limitadas pela deficiência hídrica ou distribuição irregular das chuvas, ocorrendo a necessidade de se adotar novas tecnologias de cultivo, como a irrigação. (KOBAYASHI, 2007).

Segundo Bredemeier; Mundstock (2000); Lima Filho Malavolta (2003), o nitrogênio (N) no cafeeiro é um dos nutrientes mais influenciados pela disponibilidade hídrica, especialmente na fase de frutificação, quando é fortemente drenado das folhas para os frutos. Para atender essa demanda empregam-se doses elevadas de fertilizantes procurando aumentar a absorção e assimilação do N no interior da planta.

O N além de ser o elemento mais abundante na atmosfera, é em geral, o que mais frequentemente limita o crescimento das plantas. Muitos compostos bioquímicos importantes das células vegetais possuem nitrogênio. Ele é encontrado nos nucleotídeos e nos aminoácidos, que formam a estrutura dos ácidos nucléicos e proteínas, respectivamente. Também são encontrados em enzimas, coenzimas e vitaminas, pigmentos e outros produtos secundários.

Esse nutriente favorece o crescimento e formação de raízes e folhas, produção e translocação de fotoassimilados, e o desenvolvimento de gemas floríferas e frutíferas, (MALAVOLTA et al. 1997; TEIXEIRA et al., 2013).

Em regiões produtoras de café, o N é o nutriente mineral mais requerido nos processos de crescimento, desenvolvimento e produção, sendo, assim, necessário em todos os estádios de desenvolvimento dessa cultura (SALAMANCA-JIMENEZ et al., 2017). Com isso, a correta utilização de fontes e doses de N, a forma adequada de aplicação, bem como a importância em se conhecer os processos e interações que ocorrem no sistema solo-planta-atmosfera é de suma importância para um melhor aproveitamento desse nutriente pela planta (MALTA et al., 2003).

Quando fertilizantes a base de N são aplicados no solo, uma fração do elemento é recuperado pelo sistema radicular e pela parte aérea, outra parte continua no solo, ao mesmo tempo em que pode permanecer imobilizada no *litter* ou pode se perder do sistema solo-planta. Alguns trabalhos realizados em diferentes sistemas agrícolas revelaram que dificilmente uma cultura aproveita mais de 60% do nitrogênio usado como fertilizante. O restante pode continuar no solo, acessível para as culturas seguintes ou pode se perder por diferentes meios como, a volatilização, desnitrificação, lixiviação ou levado pela erosão (FENILLI, 2006).

O nitrato (NO_3^-) é a principal forma de nitrogênio absorvido pelos vegetais, contudo é necessário que esse íon seja reduzido a amônio (NH_4^+), para ser incorporado nos inúmeros compostos orgânicos. Esse processo de redução do nitrato requer a atividade de duas enzimas: (1) redutase do nitrato (NR), e (2) redutase do nitrito (NRi) (VIÉGAS; SILVEIRA, 2002; FONTES et al., 2008).

A NR catalisa a primeira etapa do processo de assimilação do nitrogênio, reduzindo o nitrato a nitrito (NO_2^-) no citosol. Em seguida, o NO_2^- é transportado do citosol para os cloroplastos nas folhas e para os plastídios nas raízes, onde é reduzido a NH_4^+ pela atividade da NRi. O NH_4^+ , é então, rapidamente assimilado a aminoácidos pelas ações sequenciais das enzimas glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT), chamada de rota GS/GOGAT (FONTES et al., 2010).

A assimilação do nitrogênio é essencial para o crescimento e o desenvolvimento do cafeeiro, resultando em efeitos importante sobre a fitomassa e a produtividade final da cultura. Assim, como a maioria dos nutrientes, o nitrogênio é absorvido pelas raízes utilizando a água como meio de transporte, com isso o estresse hídrico e o nitrogênio podem afetar direta e indiretamente diversos processo fisiológicos, tais como a utilização eficiente da radiação,

assimilação líquida de carbono, devido a limitações estomáticas e não estomáticas e translocação do próprio N pela planta (REIS et al., 2009).

As plantas quando sujeitas a diversos tipos de estresses abióticos, principalmente o hídrico podem apresentar alterações nas respostas metabólicas e fisiológicas. O aumento de solutos compatíveis como a prolina, é um exemplo dessas respostas, e tem sido relacionado com a tolerância das plantas a esses estresses, sendo capaz de controlar a perda de água, por meio do aumento do potencial hídrico (BRAY, 2000; FUMIS; PEDRAS, 2002).

Sob influência do estresse, o metabolismo de aminoácidos é bastante modificado, reduzindo a síntese de proteínas e induzindo a rápida degradação de proteínas, o que leva aumento de aminoácidos e aminas livres. Com isso, há aumento na síntese de prolina causada pelo aumento de certos metabólicos como poliaminas, amônia, arginina, ornitina, glutamina e glutamato (SILVEIRA et al., 2002; SODEK, 2004).

O aumento nas quantidades de prolina pode estimular diferentes funções celulares como ajustamento osmótico, reserva de carbono e nitrogênio empregado no crescimento para recuperação após estresse, desintoxicação do excesso de amônia, estabilização de proteínas e membranas e eliminação de radicais livres (PAULUS et al., 2010).

Afinal, as muitas limitações no estudo sobre o metabolismo do nitrogênio e as relações hídricas do cafeeiro apresentam obstáculos a serem dominados em estudos futuros. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo do nitrogênio em quatro variedades de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em fase vegetativa, submetidas ao déficit hídrico e doses de nitrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Durante a condução do experimento foram medidas a temperatura *in loco* e a umidade relativa do ar (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Foram utilizadas quatro variedades de *Coffea arabica* L. (Mundo Novo, Acauã, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo) com seis meses de idade produzidas em sistema hidropônico.

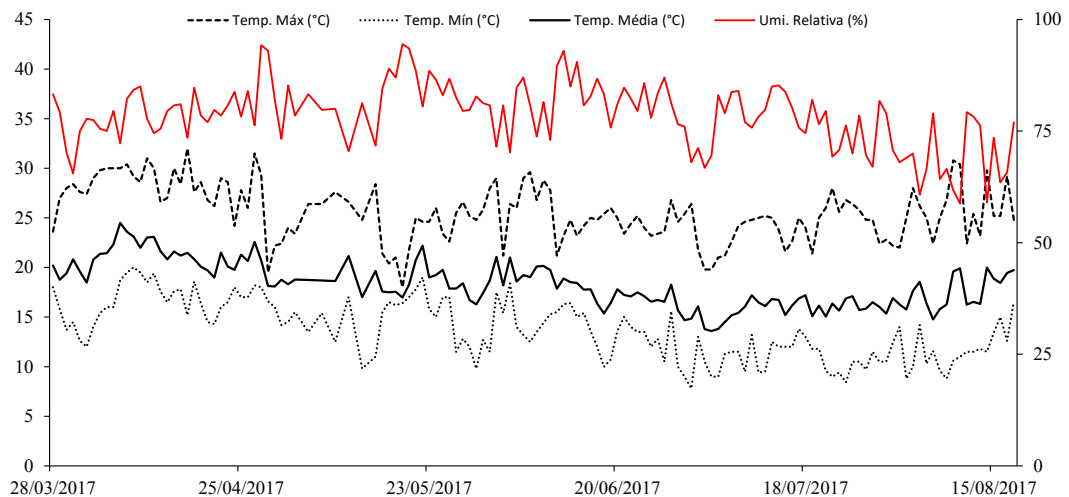


Figura 1- Umidade Relativa do ar (%) e temperaturas (°C) mínimas, máximas e médias diárias e entre março de 2017 e agosto de 2017 (Fonte: INMET).

O experimento foi conduzido durante 140 dias. Cada unidade experimental recebeu 4,5 litros de solução nutritiva. A solução nutritiva adotada para o cultivo continha: 2,8 mmol/L NO_3^- como nível baixo de nitrato (NB) e 7 mmol/L NO_3^- como nível alto de nitrato (NA), 1 mmol L^{-1} P, 4,8 mmol L^{-1} K, 1 mmol L^{-1} Mg, 1 mmol L^{-1} S, 2,1 mmol L^{-1} Ca, 40 mmol Fe-EDTA, 23 $\mu\text{mol L}^{-1}$ B, 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu, 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mn, 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Mo e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn. Os recipientes receberam aeração constante durante todo o experimento e correções de pH para manter o valor em torno $6 \pm 0,2$, utilizando-se HCl ou NaOH. Foram realizados monitoramento e reposições periódicas dos nutrientes, com base na redução da condutividade elétrica (CE) admitindo-se até 30% de depleção, exceto para o nitrogênio. Para nitrato foi adotado o critério de redução dos 30% da concentração utilizando o sensor LAQUA Twin Nitrate NO_3 Meter®. À medida que diminuía o volume da solução com a evapotranspiração, era feita a reposição com água deionizada até completar o volume total do vaso.

Para a indução do déficit hídrico as soluções foram renovadas e acrescidas das quantidades de PEG 6000 calculadas (Polietileno glicol) para gerar potenciais hídricos de -0,4; -0,8; e -1,6 MPa (VILELA et al., 1991). As quantidades utilizadas por litro de solução para os potenciais hídricos definidos foram 172,6 g, 240,2 g e 335,8 g, respectivamente. Essas quantidades foram fracionadas em 6 parcelas e aplicadas diariamente durante seis dias de modo a impor o déficit de forma gradativa. A plantas permaneceram sob estresse por um período de 76 dias.

Aos 140 dias após a imposição de todos os tratamentos (doses de N e déficit hídrico) foram retirados aproximadamente 1,0 g de raízes finas e 7 discos foliares com peso aproximado de 0,45 g das folhas totalmente expandidas, presentes no terço médio das plantas de café. Em seguida, as amostras foram lavadas em água deionizada, armazenadas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer à -80 °C para posterior análise.

2.2. Determinação de nitrogênio total na matéria seca de folhas e raízes

Ao final do experimento amostras de folhas e raízes foram lavadas com água deionizada, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C, até peso constante. A seguir, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley, e submetidas a digestão sulfúrica e determinação do N total pelo método de Kjeldahl (MALAVOLTA et al., 1997).

2.3. Determinação da concentração de nitrato nas raízes

As raízes coletadas foram lavadas em água deionizada e secas em estufa a 70 °C até atingirem massa constante. Posteriormente, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey e acondicionadas em embalagens de papel. Na extração de nitrato (CATALDO et al., 1975) utilizou-se 0,1 g de matéria seca e 10 mL de água deionizada, colocados em banho maria por 1 hora. Após extração, foi adicionado, por meio de medida calibrada, 0,5 g de carvão ativado por amostra para a obtenção de extratos incolores. Após agitação e repouso de 10 minutos, o material foi filtrado em papel filtro quantitativo de filtração lenta.

As concentrações de nitrato em raízes foram determinadas pelo método colorimétrico descrito por Doane e Horwath (2003). Adicionou-se 50 µL do extrato em 1,0 mL do meio de reação. O reagente de reação foi preparado pela adição, em meio ácido, de cloreto de vanádio (VCl_3), sulfanilamida e N-(1-naftil) -etilamina, o qual ao ser adicionado a amostra promove a dissociação do VCl_3 , e o V (III) originado desta dissociação reduz o nitrato presente na amostra a nitrito e óxido nítrico, que capturados pelo reagente de Griess, promovem a formação de uma coloração avermelhada/rósea. Após o período de reação de aproximadamente 6 horas, as concentrações de nitrato em raízes das amostras foram quantificadas por espectrofotometria a 540 nm em espectrofotômetro da marca HITACHI e modelo U-3210 estimado com base em curva de calibração preparada com padrões de NO_3^- .

2.4. Preparo dos extratos para análises das atividades enzimáticas (NR e GS)

A extração foi realizada segundo protocolo proposto por Radin (1974), adaptado por Cambraia et al., (1989), com algumas alterações para a cultura do café. Amostras contendo cerca de 0,2 g de tecido foliar e 0,4 g de raízes finas foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, com 0,2 g de PVPP (Polivinilpirrolidona). Posteriormente, foram adicionados 2 mL de um meio de extração constituído de tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 8,1, NiSO₄ 4 mmol L⁻¹, glutatona reduzida 20 mmol L⁻¹ e 20 µmol L⁻¹ de PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride). Os extratos brutos foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 14.000 g durante 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (extrato bruto) foi transferido para outro microtubo envolto com papel alumínio, acondicionado em recipiente com gelo moído e, em seguida utilizado para determinação da atividade das enzimas NR e GS.

2.4.1. Determinação da atividade da redutase do nitrato (NR)

Para determinação da atividade da redutase do nitrato foi utilizado o ensaio *in vitro* seguindo a metodologia de Radin (1974), adaptado por Cambraia et al., (1989). Alíquotas de 0,3 mL do extrato enzimático foram adicionadas a 0,7 mL de um meio de reação constituído de 200 mmol L⁻¹ de tampão tris-HCl, pH 7,5, 20 mmol L⁻¹ de KNO₃, 0,1 mmol L⁻¹ de NADH e de triton X-100 1% (v/v), sendo a mistura incubada à 37 °C por 50 minutos na ausência de luz. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de sulfanilamida 1% (p/v) em mistura com N-naftil etilenodiamino 0,01% (m/v) em HCl 1,5 mol L⁻¹. Após 30 minutos de repouso, o nitrito produzido foi determinado a 540 nm, utilizando espectrofotômetro modelo U-3210 (HITACHI). Os teores de nitrito nas amostras foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões de nitrito e a atividade enzimática foi expressa em µmol de NO₂⁻ h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

2.4.2. Determinação da atividade da glutamina sintetase (GS)

A determinação da atividade da enzima glutamina sintetase foi realizada utilizando o método proposto por Elliott (1953), que se baseia na formação de λ-glutamilhdroxamato. A atividade da GS foi avaliada pela adição de 0,2 mL do extrato a 0,8 mL do meio de reação constituído de 100 mmol L⁻¹ de tampão Tris-HCl, pH 7,5, 10 mmol L⁻¹ de 2-mercaptoetanol, 40 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 10 mmol L⁻¹ de NH₂OHCl, 10 mmol L⁻¹ de ATP e 50 mmol L⁻¹ de

glutamato. O meio foi incubado em banho-maria por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, a reação foi paralisada com a adição de 1,0 mL da solução de cloreto férrico, contendo 370 mmol L⁻¹ de FeCl₃, 370 mmol L⁻¹ de HCl e 200 mmol L⁻¹ de ácido tricloro-acético (TCA). Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 g. O quelato Fe-L-glutamil-γ-hidroxiato (GHA) produzido foi quantificado a 540 nm em espectrofotômetro da marca HITACHI e modelo U-3210 e estimado com base em curva de calibração preparada com padrões de GHA. Os resultados foram expressos em μmol de λ-GH h⁻¹ mg⁻¹ de matéria fresca.

2.5. Extração metanólica para análises de aminoácidos livres e proteínas solúveis

A extração foi realizada segundo protocolo proposto por Lisek et al. (2006). Aproximadamente 30 mg de tecido foliar fresco foram pulverizados em nitrogênio líquido e posteriormente os metabólitos foram extraídos em série por clorofórmio:metanol:água (2:1:2). Primeiramente adicionou-se o metanol, onde o extrato foi agitado por 20 minutos a 80 °C em um termomixer a 85 g. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 18.440 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e foi adicionado clorofórmio e água ultrapura. As amostras foram centrifugadas a 1.505 g a 4 °C durante 15 minutos. Após a centrifugação, retirou-se 800 μl da fase superior (fase polar) para um novo tubo para quantificação de aminoácidos. O precipitado foi lavado duas vezes em etanol 70%, e posteriormente utilizado para a quantificação de proteínas (GIBON et al., 2004).

2.5.1. Determinação da concentração de aminoácidos livres

A concentração de aminoácidos livres foi determinada conforme descrito por Gibon et al., (2004). Para a reação, foram combinados 50 μL do extrato metanólico, 50 μL de tampão citrato pH 5,2 contendo ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100 μL de ninhidrina 1 % (p/v) em etanol 70 % (v/v). A reação foi incubada a 95 °C por 20 minutos em ambiente escuro. Após esse tempo, a amostra foi lida a 570 nm. A concentração de aminoácidos livres nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de leucina e os resultados expressos em μmol g⁻¹ de matéria fresca.

2.5.2. Determinação da concentração de proteína total solúvel

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada segundo Gibon et al., (2004). O precipitado resultante da extração metanólica foi ressuspensionado em 400 μL de NaOH 0,1 M. As amostras foram incubadas por 1 hora a 95 °C sob agitação e em seguida centrifugadas por 5 min a 18.440 g, à 4 °C. Uma alíquota de 5 μL do sobrenadante foi adicionada a 250 μL

da solução do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) e, posteriormente lida em espectrofotômetro da marca Thermo Sciectic Multiskan GO no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas solúveis nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e os resultados expressos em mg g^{-1} de matéria fresca.

2.6. Determinação da concentração de prolina livre

A determinação da concentração de prolina livre foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Shabnam (2016). Amostras de 100 mg de tecido radicular foram homogeneizadas em 1 mL de ácido sulfossalicílico 3 % (p/v), seguido de centrifugação a 5.292 g por 10 min. Em seguida, foram coletados 100 μL do extrato e adicionados a 200 μL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6 M). As amostras foram incubadas por 1 hora a 100 °C e, em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram transferidas para placas de microtitulação com 96 poços e lidas no comprimento de onda de 520 nm, em espectrofotômetro da marca Thermo Sciectic Multiskan GO. As absorbâncias foram comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca.

2.7. Delineamento experimental e análise estatística

As unidades experimentais receberam as combinações de 3 fatores, duas doses de nitrogênio (alta e baixa), quatro potenciais hídricos: 0; -0,4; -0,8; e -1,6 MPa e quatro variedades: Mundo novo, Acauã, Catuaí vermelho e Catuaí Amarelo, que compuseram um esquema fatorial triplo (2 x 4 x 4) em delineamento de blocos ao acaso com três repetições para as variáveis NR, GS, nitrato, aminoácidos e proteínas, e com duas repetições para prolina e NR em raízes.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, pressuposto para análise de variância. A variável proteína para atender o pressuposto foi transformada em logaritmo neperiano (Ln). Para as demais variáveis não foi necessária transformação dos dados.

Após atender ao pressuposto, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Os dados qualitativos (doses de N e variedades) foram comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os dados quantitativos (potencial hídrico) foram submetidos a análise de regressão polinomial. Os modelos foram escolhidos com base no comportamento biológico, e significância dos coeficientes de regressão, utilizando o teste t a 5 % de probabilidade no coeficiente de determinação. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa

SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011), ao nível de 5 % de probabilidade, e os ajustes dos modelos de regressão, foram feitos pelo programa gráfico estatístico SigmaPlot 10.0® (Systat Software Inc.).

3. RESULTADOS

Não houve interação significativa entre os três fatores estudados, em nenhuma das variáveis analisadas ($P < 0,05$).

Em dose alta de nitrogênio (NA), a concentração de nitrogênio total (g kg^{-1}) tanto nas folhas quanto nas raízes foi superior em relação a dose baixa de nitrogênio (NB) em todos os potenciais hídricos avaliados

Tabela 1- Concentração de nitrogênio total em folhas e raízes, nitrato em raízes, atividade da nitrato redutase (NR) e da glutamina sintetase (NR) em folhas de cafeeiros sob doses de nitrogênio (N alto e N baixo) em diferentes potenciais hídricos (MPa), em sistema hidropônico.

Dose de N	PEG(MPa)			
	0,0	-0,4	-0,8	-1,6
N Total Foliar (g kg^{-1} de MS)				
N alto	30,99 a	23,41 a	24,20 a	25,67 a
N baixo	21,08 b	20,58 b	21,34 b	22,45 b
CV (%)	8,43			
N Total Raízes (g kg^{-1} de MS)				
N alto	29,09 a	20,95 a	21,82 a	22,75 a
N baixo	17,91 b	16,07 b	17,07 b	17,20 b
CV (%)	13,03			
Nitrato (mg g^{-1} de MS)				
N alto	13.92658 a	1.847917 a	2.918750 a	3.469817 a
N baixo	2.173750 b	1.999350 a	3.134408 a	3.777375 a
CV (%)	65.77			
NR ($\text{NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF)				
N alto	0.378800 a	0.208217 a	0.187217 a	0.192517 a
N baixo	0.090558 b	0.074175 b	0.126850 a	0.094817 b
CV (%)	48.02			
GS ($\lambda\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de MF)				
N alto	0.155634 a	0.168066 a	0.232415 a	0.182754 a
N baixo	0.191365 a	0.190393 a	0.193920 a	0.234028 b
CV (%)	29.58			

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.1. Atividade da nitrato redutase, glutamina sintetase e concentração de nitrato nas raízes

A concentração de nitrato (NO_3^-) nas raízes das quatro variedades não variou em resposta ao déficit hídrico e nem às doses de N. Porém, houve interação entre as doses de nitrogênio e os diferentes potenciais hídricos. Quando o déficit hídrico foi aplicado as plantas sob baixa disponibilidade de nitrogênio não apresentaram diferença significativa no teor de nitrato radicular, sendo o valor próximo de $2,77 \text{ mg g}^{-1}$ de matéria seca (Figura 1A).

Já em dose alta de nitrogênio, houve queda do teor de nitrato à medida que aumentava o déficit hídrico. Essa queda seguiu uma função quadrática e foi acentuada quando se passou da condição sem estresse para $-0,4 \text{ MPa}$ de estresse. Observou-se que na alta disponibilidade de nitrogênio a concentração de nitrato atingiu o ponto mínimo no potencial hídrico $-1,03 \text{ MPa}$ (Figura 1A). O teor de nitrato radicular foi maior na dose NA apenas quando as plantas não sofreram restrição hídrica ($0,0 \text{ MPa}$). Sob qualquer grau de restrição hídrica essa concentração se igualou à das plantas cultivadas com dose NB (Tabela 1).

Em relação à atividade da enzima nitrato redutase (NR) houve interação entre as doses de nitrogênio e os potenciais hídricos. Mesmo com a dose NA verificou-se diminuição da atividade da nitrato redutase com aumento do déficit hídrico. A menor atividade da NR ($0,149 \mu\text{mol de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca), ocorreu no potencial hídrico de $-1,09 \text{ MPa}$. Não houve diferença na atividade da NR entre a NB nos potenciais hídricos, onde os valores concentraram-se em torno da média $0,09660 \mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF (Figura 1B).

Quando avaliadas as doses de N dentro de cada potencial hídrico, observou-se que a atividade da enzima nitrato redutase (NR) nas folhas apresentou os maiores valores, sob alta disponibilidade de nitrogênio nos potenciais hídricos $0,0$; $-0,4$; $-1,6 \text{ MPa}$ ($P > 0,05$). Para as doses de N dentro do potencial hídrico de $-0,8 \text{ MPa}$ não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 1).

No potencial hídrico ($0,0 \text{ MPa}$) a atividade da nitrato redutase em dose alta de nitrogênio (NA) foi aproximadamente quatro vezes maior que a atividade em dose baixa (NB). Contudo à medida que o potencial hídrico reduziu a diferença da atividade NR entre as doses também diminuiu, isto é, nos potenciais hídricos $-0,4$ e $-1,6 \text{ MPa}$ a atividade enzimática em NA foi aproximadamente três e duas vezes superior em relação a dose NB, respectivamente (Tabela 1).

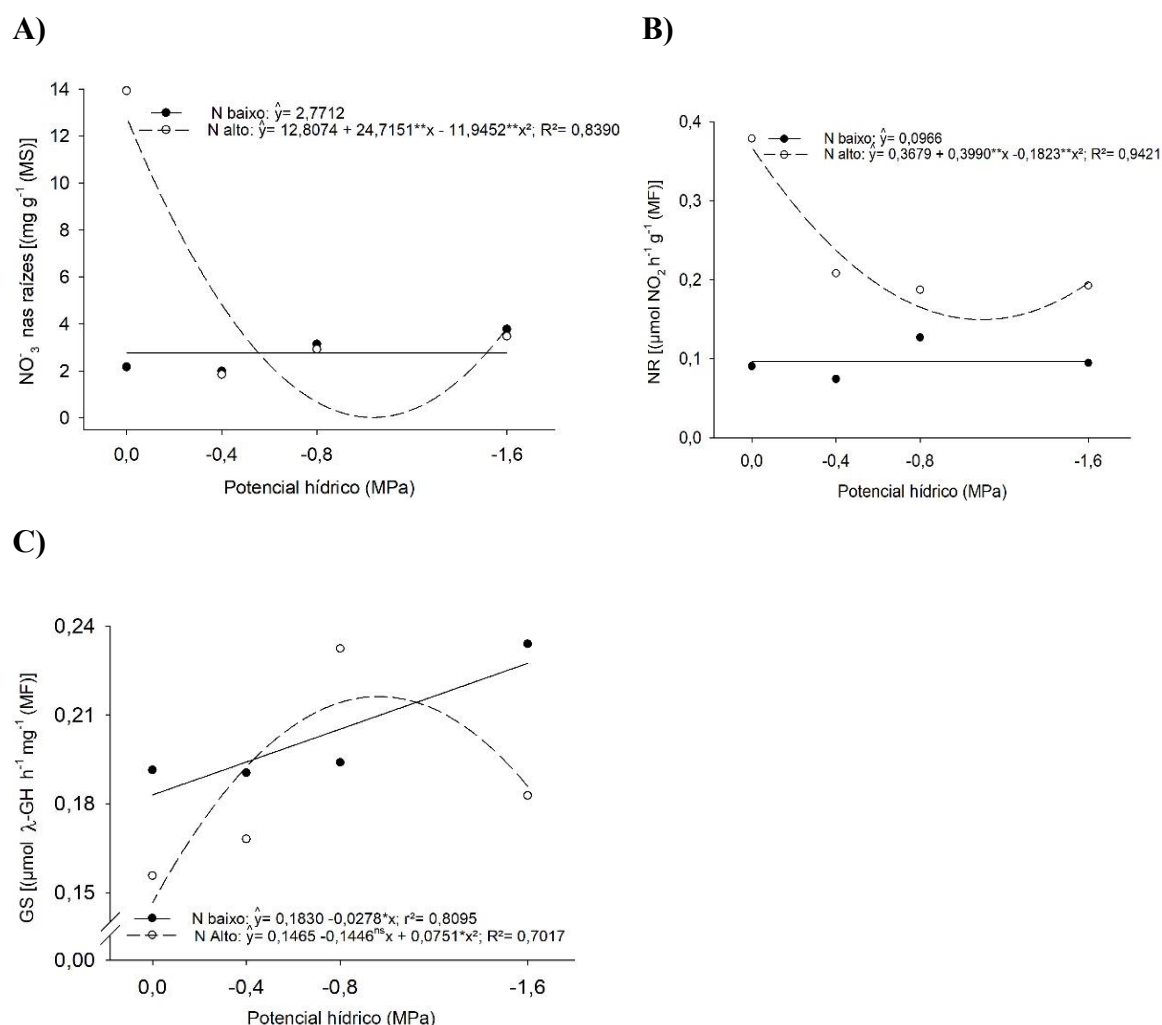


Figura 2- Concentração de nitrato em raízes (A), atividade da nitrato redutase (B) e atividade da glutamina sintetase (C) em folhas de cafeeiro submetidos a doses de nitrogênio (N baixo e N alto) e diferentes potenciais hídricos, em sistema hidropônico.

Houve interação entre as doses de nitrogênio e os potenciais hídricos ($P < 0,05$). Em ambas as doses de nitrogênio a atividade da glutamina sintetase (GS) aumentou conforme diminuição do potencial hídrico (Figura 1C). Na média das quatro variedades cultivadas com dose NA a atividade da GS sofreu incrementos com o aumento do déficit hídrico, segundo função quadrática. Nesse caso, o ponto de máxima foi alcançado com $-0,96$ Mpa. Quando em baixa disponibilidade de N a atividade da GS aumentou linearmente com o déficit hídrico. Observou-se também diferença na atividade entre as doses de N no potencial hídrico $-1,6$ MPa, sendo que na dose NB a atividade da GS foi 22 % maior em relação a dose NA (Tabela 1).

Houve interação entre as doses de nitrogênio e os potenciais hídricos ($P < 0,05$). Em ambas as doses de nitrogênio a atividade da glutamina sintetase (GS) aumentou conforme diminuição do potencial hídrico (Figura 1c). Na média das quatro variedades cultivadas com dose NA a atividade da GS sofreu incrementos com o aumento do déficit hídrico, segundo função quadrática. Nesse caso, o ponto de máxima foi alcançado com $-0,96$ Mpa. Quando em baixa disponibilidade de N a atividade da GS aumentou linearmente com o déficit hídrico. Observou-se também diferença na atividade entre as doses de N no potencial hídrico $-1,6$ MPa, sendo que na dose NB a atividade da GS foi 22 % maior em relação a dose NA (Tabela 1).

Independentemente do deficit hídrico e da disponibilidade de N, houve diferença na atividade da NR entre as variedades (Figura 2). Para essa variável obteve-se maior valor na variedade Acauã e menor valor em Catuaí Vermelho. A variedade Acauã apresentou atividade da NR 31 % superior em relação à atividade da NR da Catuaí Vermelho.

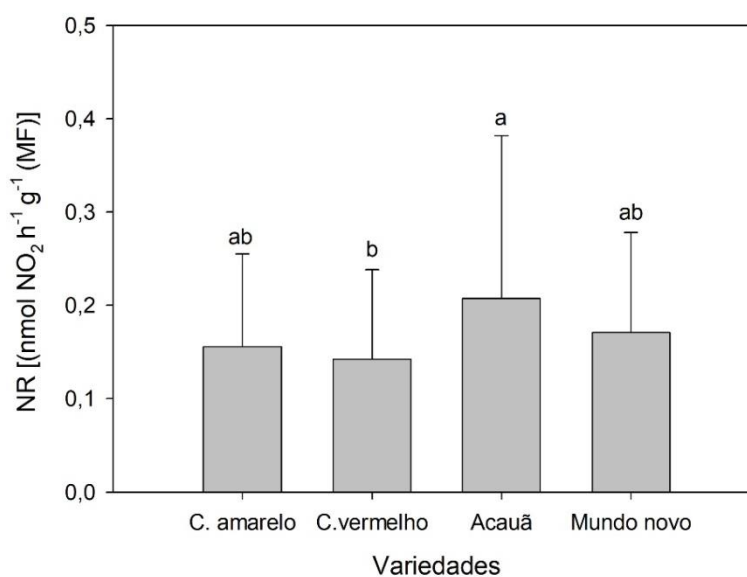


Figura 3- Atividade da nitrato redutase (NR) foliar em quatro variedades de cafeeiros cultivadas em sistema hidropônico. Média seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação a atividade da NR em raízes, a dose alta de nitrogênio se diferenciou da dose baixa de N, sendo que a atividade enzimática com dose NA foi 43 % superior em relação a dose NB ($P < 0,05$) (Figura 3).

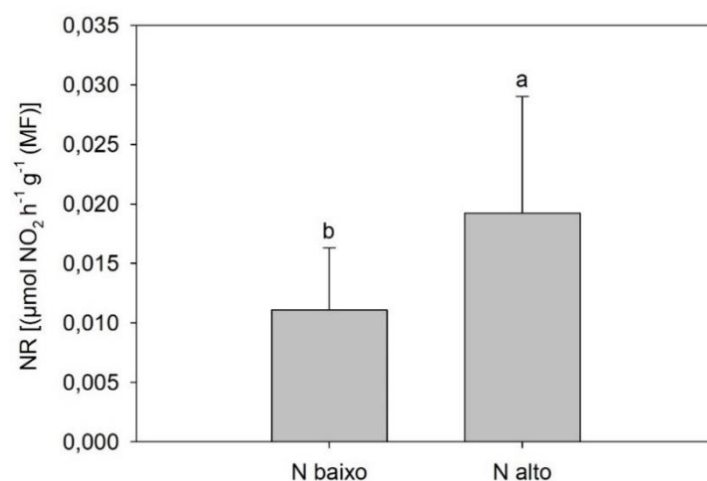


Figura 4- Atividade da nitrato redutase (NR) em raízes de cafeeiro cultivadas com doses de nitrogênio (N baixo e N alto) em sistema hidropônico. Média seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2. Concentração de prolina, aminoácidos e proteínas

Com relação às doses de N, verificou-se que a dose alta promoveu maior concentração de prolina em raízes (Figura 4A) e concentração de aminoácidos totais (AAS) nas folhas ($P < 0,05$) (Figura 4B), independentemente de variedade ou de déficit hídrico. Observou-se que os teores de prolina livre em dose de NA foram aproximadamente 49 % maiores em relação à dose NB. Em relação à concentração de aminoácidos totais nas folhas, observou-se que em dose NA a concentração de aminoácidos foi aproximadamente 1,7 vezes maior que em dose NB.

A)

B)

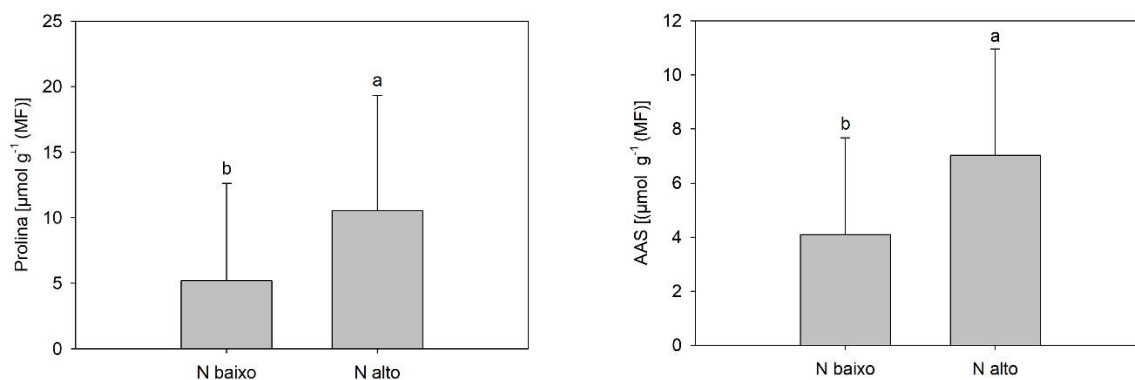


Figura 5- Concentração de prolina livre em raízes (A) e de aminoácidos totais (B) em folhas de cafeeiro sob doses de nitrogênio (N baixo e N alto) em sistema hidropônico. Média seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Houve aumento linear do teor de prolina com aumento do déficit hídrico, ($P < 0,05$) (Figura 5). A concentração de prolina em potencial hídrico $-1,6$ MPa ($15,90 \mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$) foi quase 10 vezes maior que no controle ($1,62 \mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$).

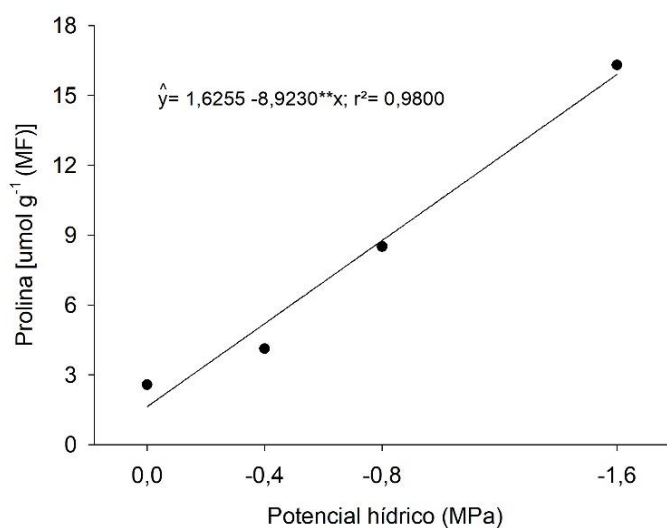


Figura 6- Concentração de prolina livre em raízes ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) de cafeeiro nos diferentes potenciais hídricos em sistema hidropônico.

Para proteínas totais solúveis nas folhas as concentrações só se mostraram inferiores na baixa dose de N para as variedades Mundo Novo e Catuaí Amarelo ($P < 0,05$) (Figura 6). Houve interação entre as doses de N e as variedades quando analisados para a concentração de proteínas totais. As variedades Catuaí Amarelo e Mundo Novo se diferenciaram em relação às doses de nitrogênio. Em dose NA, a concentração de proteínas foi 40 % e 38 % superior em

relação à dose NB, em C. Amarelo e Mundo Novo, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade de proteínas das variedades C. Vermelho e Acauã, quando se comparou entre as doses de N (Figura 6).

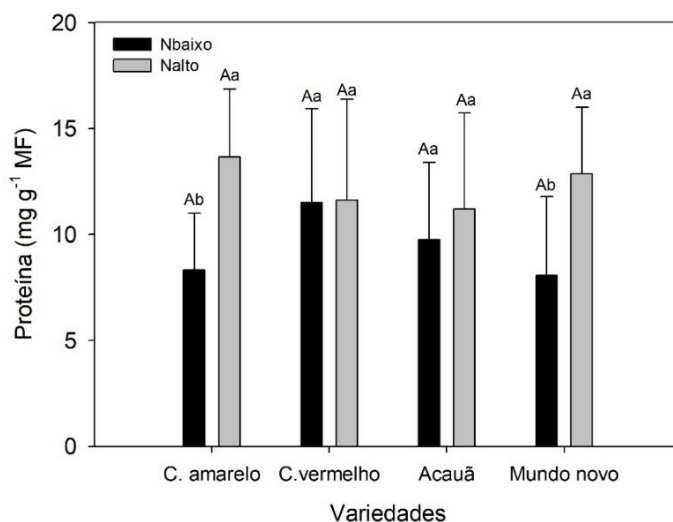


Figura 7- Concentração de proteínas totais solúveis (mg g⁻¹ MF) em folhas de cafeeiros sob doses de nitrogênio (N baixo e N alto) em sistema hidropônico. Médias seguidas de mesmas letra maiúscula ou minúscula são iguais entre si pelos testes tukey e F de Fischer ao nível de 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A assimilação do nitrogênio é fundamental para o desenvolvimento, crescimento e produtividade das plantas, porém como faz parte de diferentes rotas metabólicas, é influenciada pelo déficit hídrico. Com isso, durante a falta de água as enzimas envolvidas na redução do nitrato em amônio e, posteriormente sua incorporação em compostos orgânicos, apresentam importante função na sobrevivência das plantas (FERREIRA et al., 2002).

Neste trabalho a exposição de variedades de café a alta dose de N e baixos valores de potencial hídrico promoveu a diminuição do teor de nitrato nas raízes, e conseqüentemente a diminuição da atividade da enzima NR (Figura 1A). Acredita-se que essa menor concentração seja resultado da menor absorção de nitrato pelas plantas ao longo do déficit hídrico (Tabela 1). O nitrato além de controlar a atividade da NR, por estimular a sua síntese, possui atuação sobre as proteínas de transporte associadas à absorção e armazenamento do nitrato no vacúolo, e sobre

as enzimas redutase do nitrito, glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (SODEK, 2004; LIMA et al., 2008).

Os resultados encontrados para a atividade da enzima NR, podem ser explicados pelo fato da atividade da NR tanto nas folhas quanto nas raízes, ser bastante alterada por fatores ambientais, como por exemplo: luz, temperatura, disponibilidade de nitrogênio e disponibilidade hídrica. O nitrogênio no solo induz a síntese proteica, como por exemplo, da enzima nitrato redutase. Contudo, se a planta passa por uma condição de estresse hídrico, sua atividade pode ser limitada, devido à redução na absorção de nitrato pelas raízes, em consequência da falta de água (MARUR et al., 2000; CARELLI; FALH, 2006; LIMA et al., 2008).

Reis et al., (2005), avaliando a atividade da NR em cafeeiro em função de diferentes doses e sistemas de aplicação de nitrogênio, concluíram que a atividade da enzima redutase do nitrato responde à adubação nitrogenada, ou seja, aumenta com as doses crescentes de nitrogênio, interferindo diretamente na produtividade. Resultados semelhantes em cafeeiro também foram encontrados por Khouri (2007).

Já Marur et al., (2000) em algodoeiro submetido ao estresse hídrico, verificaram que a atividade da NR em doses baixas de nitrato permaneceu inalterada, ao mesmo tempo que nas plantas que foram adubadas com este nutriente apresentou aumento, corroborando os resultados apresentados neste experimento. Segundo Khouri (2007) a diminuição da atividade do nitrato redutase por efeito de déficit hídrico, ocorre devido redução no fluxo de nitrato, por insuficiência de água, sendo esse substrato essencial na formação e atividade desta enzima.

Estes dados comprovam que mesmo com alta disponibilidade do nitrogênio, as plantas sob déficit hídrico, tendem a diminuir a atividade da NR, devido à redução da absorção de nitrogênio, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (Figura 1B) (Tabela 1).

Entre as variedades, observou-se maior atividade da NR em Acauã (Figura 2), justificando ao menos parcialmente, a sua maior tolerância à seca, pois ela consegue, sob déficit hídrico, manter a atividade enzimática com menor alteração. Segundo Matiello et al., (2010), a variedade Acauã apresenta características como alta capacidade produtiva, imunidade à ferrugem do cafeeiro, boa tolerância ao nematoide *M. exigua*, alto vigor e tolerância ao déficit hídrico. Em grandes períodos de deficiência hídrica, variedades como Catuaí e Mundo Novo,

passam por estresse e desfolhamento, acentuados pelo ataque de doenças como a ferrugem e cercosporiose, enquanto lavouras de Acauã permanecem verdes e devidamente enfolhadas.

Em um estudo realizado por Carvalho et al., (2017) avaliando o potencial hídrico em novas cultivares de café, concluíram que materiais de Acauã, apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico, diferentemente das variedades de Catuaí. Resultados contrários encontrados por Souza et al., (2015), verificaram que mudas de café arábica submetidas a estresse hídrico e deficiência de nitrogênio, as variedades Acauã e Mundo Novo apresentaram maiores impactos do déficit hídrico, porém em um período menor de estresse (96 horas). Acredita-se que um maior período de déficit hídrico as plantas de Acauã conseguiram se adaptar e apresentar uma resposta em relação a atividade NR maior que as demais variedades.

Além da atividade da NR em folhas, observou-se também atividade nas raízes, onde em alta dose de nitrogênio as médias das variedades para essa enzima foi maior que em baixa dose de N (Figura 3). Fertilização nitrogenada tende a beneficiar o crescimento, desenvolvimento e conseqüentemente a produção do cafeeiro, mesmo quando associadas a fatores ambientais restritivos como: temperatura, alta luminosidade e escassez de água. A cultura do café demonstra elevado potencial de reduzir e assimilar o nitrato tanto nas folhas quanto nas raízes. Essa repartição entre o sistema radicular e a parte aérea é influenciado conforme a espécie, idade e fatores do ambiente (CARELLI e FAHL, 2006).

Essa repartição da atividade da NR entre os órgãos é regulada basicamente pela eficiência do sistema radicular de exportar nitrato para a parte aérea, ou seja conforme aumento da disponibilidade de nitrato, as raízes dos cafeeiros demonstram alta capacidade de aumentarem a exportação deste íon para as folhas (SMIRNOFF e STEWART, 1985; GOJON et al., 1994).

Confirmando os resultados encontrados neste estudo, CARELLI e FAHL (2006), estudando o crescimento de plantas de café, observaram que a atividade da NR ocorreu em ambos os órgãos, contudo a atividade em raízes foi menor que nas folhas. No mesmo estudo, os autores constataram um maior acúmulo de nitrato nas raízes em relação às folhas, e quase nenhuma atividade da NR foi detectada em período anterior a aplicação de nitrato. Já segundo Melo et al., 2014, houve diminuição da assimilação de nitrogênio, e conseqüentemente redução da atividade da NR em raízes da cultivar Siriema sob déficit hídrico, concordando com os dados

encontrados neste trabalho, onde a atividade da NR das raízes foi superior na dose NA (Figura 3).

O amônio produzido pela redução do nitrato é incorporado em compostos orgânicos, formando em seguida os aminoácidos. Estas reações são decorrentes da atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). A GS desempenha uma posição central no metabolismo do N nas plantas, em razão de ser responsável pela assimilação inicial do amônio (GREGERSON et al., 1993; DONATO et al., 2004). Observou-se neste trabalho aumento da GS conforme aumento do déficit hídrico, em ambas as doses de nitrogênio (Figura 1C).

Nas plantas estão presentes duas isoformas da enzima glutamina sintetase (GS), uma localizada no citoplasma (GS1) e outra no cloroplasto (GS2) (HIREL et al., 1984). A GS1 tem a função de assimilação de amônio no citoplasma em condição de escuro, enquanto a GS2 encontrada nas folhas é governada pela luz e pelo amônio (NH_4^+), além do uso do NH_4^+ da fotorrespiração. Esse NH_4^+ formado no decorrer da fotorrespiração é capaz de ser reassimilado pelas plantas no cloroplasto (MCNALLY et al., 1983; HIREL et al., 1984; WALLSGROVE et al., 1987; EDWARDS e CORUZZI, 1989).

Essa reassimilação do NH_4^+ disponibilizado no decorrer da fotorrespiração em plantas C3 apresenta cerca de 90 % do fluxo através da rota GS/GOGAT nas folhas. Com isso a menor atividade da nitrato redutase encontrada neste trabalho, assim como o acúmulo de nitrato, pode ter favorecido o aumento da atividade da GS, ou seja, aumentado a assimilação do NH_4^+ resultante do processo fotorrespiratório, alternativamente ao caminho normal, do amônio formado pela atividade da NR (STITT et al., 2002; ANDRADE NETTO, 2005).

Souza et al., (2015), observaram em estudo com mudas de café submetidas ao déficit hídrico, aumento da atividade da GS e da eficiência na utilização do nitrogênio. Sabe-se que o déficit hídrico levou à redução da disponibilidade dos nutrientes, já que a água possibilita a absorção da maior parte dos nutrientes pelo sistema radicular, como o nitrogênio. Com isso, com a falta de água e um aumento na concentração de amônio, faz com que haja uma maior eficiência de utilização do nitrogênio pela planta, consequentemente evitando que o íon NH_4^+ acumule em níveis tóxicos (HIREL e LEA, 2001), explicando os resultados do aumento da atividade da GS (Figura 1C).

Andrade Netto (2005), estudando a atividade da NR e da GS em cafeeiro, observou aumento da GS em plantas expostas à radiação solar, relacionando esse resultado ao aumento da disponibilidade de NH_4^+ oriundo da fotorrespiração. Contudo, foi observado baixa condutância estomática, redução na taxa transpiratória, na fotossíntese líquida e diminuição da atividade da NR, processos que também ocorrem com diminuição do potencial hídrico. Corroborando com os dados do presente trabalho, Castro (2006) observou que plantas de café sob estresse hídrico, diminuíram a atividade da NR e aumentaram a da enzima GS.

Independentemente das variedades e das doses de N, com o aumento do déficit hídrico houve aumento da concentração de prolina em raízes (Figura 5). Ao sofrerem com estresses abióticos, principalmente o estresse hídrico, as plantas tendem a acumular compostos, denominados solutos compatíveis ou osmoprotetores, tais como a prolina. Esses solutos apresentam como funções a preservação da turgidez das células, conservação da integridade de proteínas e estruturas celulares, e proporcionam a diminuição do potencial osmótico em situações de falta de água (BRAY et al., 2001; MELONI et al., 2004; BARTELS e SUNKAR, 2005; GIANNAKOULA et al., 2008).

Almeida et al., (2007) em estudo caracterizando repostas morfológicas e fisiológicas de diferentes genótipos de *Coffea* submetidos a estresse hídrico, observaram que as plantas sobreviveram em consequência do ajustamento osmótico com aumento do teor de prolina. Já Silva et al., (2010), constataram que durante o estresse hídrico os teores de prolina aumentaram em clone de café Conilon sensível ao déficit hídrico. Outros estudos relataram também aumento no teor de prolina em decorrência do aumento do déficit hídrico em milho (FERREIRA et al., 2002), soja (SILVA, 2017), cana-de-açúcar (FREITAS et al., 2011), guandu (MONTEIRO et al., 2014) e alecrim-pimenta (ALVARENGA et al., 2011).

Com relação às doses de N, verifica-se que a dose alta promoveu maior concentração de prolina em raízes (Figura 4A) e concentração de AAS nas folhas (Figura 4B) independentemente da variedade ou grau de déficit hídrico. Para proteínas solúveis totais nas folhas as concentrações só se mostraram inferiores na baixa dose de N para as variedades Mundo Novo e Catuaí Amarelo (Figura 6).

Em relação à concentração de aminoácidos totais e de proteínas, observou-se que em dose NA a concentração tanto de aminoácidos como das proteínas foi maior que em dose NB, ou seja, mesmo com a deficiência hídrica, a maior dose de N favoreceu uma maior síntese de

aminoácidos (Figura 4B) e, conseqüentemente, das proteínas (Figura 6), quando comparados com uma menor dose de N. Os aminoácidos formados durante o déficit hídrico além de suas funções particulares, podem ser utilizados como fonte de nitrogênio para síntese proteica, assim como podem ser utilizados no estoque de energia para as plantas se recuperarem de forma mais rápida da condição de estresse hídrico (SUGUIYAMA et al., 2014).

O aumento da quantidade de aminoácidos perante os déficits hídricos pode ser decorrente da diminuição da síntese proteica, ou de uma maior degradação de proteínas. Entretanto, o aumento da quantidade de aminoácidos livres, principalmente prolina, ajuda a diminuir efeitos negativos do déficit hídrico sobre as plantas (CATALA et al., 2007; KAUR e ASTHIR, 2015).

5. CONCLUSÕES

Em plantas jovens de café sob alta disponibilidade de nitrogênio, o déficit hídrico afetou negativamente o metabolismo do nitrogênio, via redução da concentração de nitrato nas raízes e atividade da NR nas folhas.

Em plantas jovens de café submetidas a baixa dose de N, a baixa concentração de nitrato nas raízes e a baixa atividade da NR nas folhas não se alteraram com déficit hídrico crescente, enquanto que a atividade da GS mostrou incrementos lineares em resposta a incrementos no déficit hídrico.

O déficit hídrico tem menor impacto na assimilação de N em plantas de café bem supridas com esse nutriente. Em qualquer nível de déficit as plantas com alta nutrição nitrogenada apresentaram maior concentração foliar de aminoácidos solúveis e de proteínas solúveis totais.

Em plantas jovens de café sob déficit hídrico a prolina participou do ajustamento osmótico, sendo sua síntese nas raízes aumentada com o aumento do déficit hídrico, e maior em plantas bem supridas com N, do que naquelas sujeitas a baixas doses de N.

As variedades Mundo Novo, Acauã, Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo de modo geral não apresentaram respostas diferenciadas ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. A. S.; CARVALHO, C. R. L.; SILVAROLLA, M. B.; ARRUDA, F.; BRAGHINI M, T.; LIMA, V. B.; FAZUOLI, L. C. **Caracterização de respostas morfológicas e fisiológicas de diferentes genótipos de *Coffea* submetidos a estresse hídrico**. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (5.: Águas de Lindóia, SP: 2007). Anais. Brasília, D.F.: Embrapa - Café, 2007.
- ALVARENGA, I. C. A.; QUEIROZ, G. A.; HONÓRIO, I. C. G.; VALADARES, R. V.; MARTINS, E. R. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 539-541, 2011.
- ANDRADE NETTO J. F. **Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005. 60p.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 3. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1158-120, 2001.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- CAMBRAIA, J.; PIMENTA, J. A.; ESTEVÃO, M. M.; SANT'ANNA, R. Aluminum effects on nitrate uptake and reduction in sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, v. 12, p. 1435-1445, 1989.
- CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I. Partitioning of nitrate reductase activity in *Coffea arabica* L. and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 397-406, 2006.
- CARVALHO, C. H. S. et al. **Avaliação do potencial hídrico em cafeeiros de novas cultivares**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. Anais... Brasília, DF: Embrapa Café, 2017.
- CASTRO, V. B. **Avaliação do Metabolismo de nitrogênio na fase reprodutiva dos cafeeiros sob déficit hídrico**. Relatório final, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 34 p, 2006. Disponível em: < www.agn.ufv.br/wp-content/uploads/2017/08/TCC-VERSÃO-FINAL-Vinicius-Batista-de-Castro.pdf >. Acesso em: 28 mai. 2019.

CATALA, R.; OUYANG, J.; ABREU, I. A.; HU, Y.; SEO, H.; ZHANG, X.; CHUA, N. H. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. **The Plant Cell**, v. 19, p. 2952-2966, 2007.

CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

DAMATTA, F. M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B. C.; BUCKERIDGE, M. S. Impactos das mudanças climáticas na fisiologia das lavouras e na qualidade dos alimentos. **Food Research International** v. 43, p. 1814-1823, 2010.

DOANE, T. A.; HORWATH, W. R. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. **Analytical Letters**, v. 36, p. 2713-2722, 2003.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, E. S.; FRANÇA, J. G. E.; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 1087-1093, 2004.

EDWARDS, J. W.; CORUZZI, G. M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. **The Plant Cell**, v. 1, p. 241-248, 1989.

ELLIOTT, W. H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas **Journal of Biological Chemistry**, v. 201, n. 2, p. 661-672, 1953.

FENILLI, T. A. B. **Destino do nitrogênio (15N) do fertilizante em uma cultura de café**. Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Piracicaba, 2006. 100p.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 32, p. 13- 17, 2002.

FONTES, R. V.; SANTOS, M. P.; FALQUETO, A. R.; SILVA, D. M. Atividade da redutase do nitrato e fluorescência da clorofila a em mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 251-254, 2008.

FONTES, R. V.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; OLIVEIRA, J. G.; SILVA, D. M.; BROETTO, S. G.; SILVA, M. M. Diferentes espaçamentos de plantio e níveis de adubação sobre a atividade da redutase do nitrato em folhas do híbrido de mamoeiro. UENF/CALIMAN-01. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1138-1145, 2010.

FREITAS, A.; MATHIAS, D.; DOMINGUES, S. Atividade da enzima redutase do nitrato e teores de prolina livre em raízes de cana-de-açúcar sob os estresses hídrico e ácido no solo. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 32, n. 4, p. 1345-1359, 2011.

FUMIS, T. F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 449-453, 2002.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 385-396, 2008.

GIBON, Y.; BLAESING, O. E.; HANNEMANN, J.; CARILLO, P.; HOHNE, M.; HENDRIKS, J. H.; STITT, M. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant Cell**, v. 16, p. 3304-3325, 2004.

GOJON, A.; PLASSARD, C.; BUSSI, C. Root/shoot distribution of NO₃⁻ assimilation in herbaceous and woody species. In: Garnier, R. J. E. (ed), **A Whole Plant Perspective on Carbon Nitrogen Interactions**. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, p. 131-147, 1994.

GREGERSON, R. G.; MILLER, S. S.; TWARY, S. N. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. **The Plant Cell**, v. 5, p. 215-226, 1993.

HIREL, B.; WEATHERLEY, C.; CRETIN, C. BERGOUNIOUX, C.; GADAL, P. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, v. 74, p. 448-450, 1984.

HIREL, B.; LEA, P. J. Ammonia assimilation. In: LEA, P. J.; MOROTGAUDRY, J. F. **Plant Nitrogen**. Berlin: Springer-Verlag, p. 79-100, 2001.

KAUR, G.; ASTHI, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum** v. 59: p. 609-619, 2015.

KHOURI, Camila Rodrigues. **Atividade da redutase do nitrato, teores de nitrogênio e de carboidratos em cafeeiro influenciados pelo sombreamento e estágio fenológico**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.63p.

KOBAYASHI, Emilio Seigui. **Consumo de água e produtividade de cafeeiros arábica na região de Mococa, SP**. 2007. Tese de Doutorado. Dissertation (MSc in tropical and subtropical agriculture), Instituto Agrônomo de Campinas, 2007.77p.

FILHO, O. F. L.; MALAVOLTA, E. Studies on mineral nutrition of the coffee plant (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho): LXIV. Remobilization and re-utilization of nitrogen and potassium by normal and deficient plants. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 481-490, 2003.

LIMA, J. D. N.; MORAES, W. S.; SILVA, S. H. G. M.; IBRAHIM, F. N.; SILVA, A. C. Acúmulo de compostos nitrogenados e atividade da redutase do nitrato em alface produzida sob diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, p. 180-187, 2008.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**. v. 1, p. 1-10, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, p. 319, 1997.

MALTA, M. R.; NOGUEIRA, F. D.; GUIMARÃES, P. T. G.; SILVA, F. D. M. Composição química, produção e qualidade do café fertilizado com diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1246-1252, 2003.

MARUR, C. J.; MAZZAFERA, P.; MAGALHÃES, A. C. Atividade da enzima e redutase do nitrato em algodoeiro submetido ao déficit hídrico e posterior recuperação da turgescência. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 277-281, 2000.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R.; BRITTO, G.; NERY, C.; JAPIASSU, L. B. **Café Acauã, o rei da Bahia**. 2010. Disponível em: <http://fundacaoprocafe.com.br/sites/default/files/publicacoes/pdf/folhas/Folha043Acaua.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2019.

McNALLY, S. F.; OREBAMJO, T. O.; HIREL, B.; STEAWART, G. R. Glutamine synthetase isoenzymes of *Striga hermonthica* and other angiosperm root parasites. **Journal of Experimental Botany**, v. 34, p. 610-619, 1983.

MEIRELLES, N. M. F.; LIBARDI, P. L.; REICHARDT, K. Absorção e lixiviação de nitrogênio em cultura de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 83-88, 1980.

MELO, E. F.; FERNANDES-BRUM, C. N.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M. D.; CHALFUN-JÚNIOR, A. Anatomic and physiological modifications in seedlings of *Coffea arabica* cultivar Siriema under drought conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 1, p. 25-33, 2014.

MELONI, D. A.; GULOTTA, M. R.; MARTINEZ, C. A.; OLIVA, M. A. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycine betaine accumulation in *Prosopis alba*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 39-46, 2004.

MENEZES-SILVA, P. E.; SANGLARD, L. M.; ÁVILA, R. T.; MORAIS, L. E.; MARTINS, S. C.; NOBRES, P.; DAMATTA, F. M. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 15, p. 4309-4322, 2017.

MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 18-25, 2014.

PAULUS, D.; NETO, D. D.; FRIZZONE, J. A.; SOARES, T. M. Produção e indicadores fisiológicos de alface sob hidroponia com água salina. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 29-35, 2010.

RADIN, J. W. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedling. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 53, p. 458-463, 1974.

REIS, A. R. D.; FURLANI, E.; BENKE, F. D. M.; PERSEGIL, E. O.; FERRARI, S. **Atividade da Enzima Redutase do Nitrato de cafeeiros em produção cultivado em diferentes níveis e sistemas de aplicação de nitrogênio**. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Londrina, 4, 2005.

REIS, A. R.; FAVARIN, J. L.; GALLO, L. A.; MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F.; LAVRES JUNIOR, J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in Coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 315-324, 2009.

SALAMANCA-JIMÉNEZ, A.; DOANE, T. A.; HORWATH, W. R. Coffee Response to Nitrogen and Soil Water Content during the Early Growth Stage. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, n. 5, p 614-623, 2017.

SIGMAPLOT, Version. 10.0, Systat Software. **Inc., San Jose, CA**, v. 95110.

SILVA, V. A.; ANTUNES, W. C.; GUIMARÃES, B. L. S.; PAIVA, R. M. C.; SILVA, V. F.; FERRÃO, M. A. G.; DAMATTA, F. M.; LOUREIRO, M. E. Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 457-464, 2010.

SILVA, A. A. **Estudo da resistência à seca em soja: avaliações fisiológicas, metabólicas e moleculares**. 2017. 102 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

SHABNAM, N.; TRIPATHI, I.; SHARMILA, P.; PARDHA-SARADHI, P. A rapid, ideal, and eco friendlier protocol for quantifying proline. **Protoplasma**, v. 253, p. 1577-1582, 2016.

SILVEIRA, J. A. G.; ROCHA, I. M. A.; VIÉGAS, R. A. **Metabolic responses of cowpea and cashew plants exposed to salt and water stress: new aspects on proline accumulation**. 2002. sbbq. iq. usp. br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Palestras/016. pdf>. Acesso em : 20 mai. 2019.

SMIRNOFF N, T. P.; STEWART, G. R. The occurrence of nitrate reduction in leaves of wood plants. **Annals of Botany**. v. 54, p. 363-374, 1984.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 94-113. 2004.

SOUZA, B. P.; MARTINEZ, H. E. P.; CAIXETA, E. T.; CARVALHO, F. P.; CLEMENTE, J. M.; LOUREIRO, M. E.; STURIAÑO, W. P. Trocas gasosas em mudas de café arábica submetidas ao déficit hídrico e deficiência de nitrogênio. In: IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Curitiba, 2015.

STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 959-970, 2002.

SUGUIYAMA, V. F.; SILVA, E. A.; MEIRELLES, S. T.; CENTENO, D. C.; BRAGA, M. R. Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-1, 2014.

TEIXEIRA, W. F.; FAGAN, E. B.; SILVA, J. O.; SILVA, P. G.; SILVA, F. H.; SOUSA, M. C.; CANEDO, S. C. Atividade da enzima nitrato redutase e crescimento de *Swietenia macrophylla* King sob efeito de sombreamento. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 1, p. 91-98, 2013.

VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Activation of nitrate reductase of cashew leaf by exogenous nitrite. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 39-44, 2002.

VILELA, F.; Filho, L.; SEQUEIRA, E. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa agropecuária brasileira**. 26 (11/12), p. 1957-1968. 1991.

WALLSGROVE, R. M.; TURNER, J. C.; HALL, N. P.; KENDALL, A. C.; BRIGHT, S. W. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetics analyses. **Plant Physiology**, v. 83, n. 1, p.155-158, 1987.

APÊNDICE A

Tabela 2- Quadrados médios para concentração de nitrato (NITR), atividade da nitrato redutase (NR), glutamina sintetase (GS), concentração de aminoácidos (AAS) e concentração de proteínas (PROT).

FV	GL	Quadrados Médios				
		NITR	NR	GS	AAS	PROT
N	1	184,091712*	0,505209*	0,007527 ^{ns}	207,187173*	205,968458*
PEG	3	173,658661*	0,046974*	0,009698*	13,815530 ^{ns}	14,033917 ^{ns}
Variedades	3	6,491324 ^{ns}	0,018833*	0,001152 ^{ns}	10,193963 ^{ns}	6,696113 ^{ns}
Bloco	2	9,902315 ^{ns}	0,000224 ^{ns}	0,002246 ^{ns}	171,121465 ^{ns}	51,942130 ^{ns}
N*PEG	3	215,225870*	0,060077*	0,009263*	14,641996 ^{ns}	19,445619 ^{ns}
N*VAR	3	11,750887 ^{ns}	0,014016 ^{ns}	0,001443 ^{ns}	2,946156 ^{ns}	38,550423*
PEG*VAR	9	4,645786 ^{ns}	0,007482 ^{ns}	0,005047 ^{ns}	8,555704 ^{ns}	12,882829 ^{ns}
N*PEG*VAR	9	8,089622 ^{ns}	0,006592 ^{ns}	0,003136 ^{ns}	5,204389 ^{ns}	13,105232 ^{ns}
ERRO	62	7,471055 ^{ns}	0,006597 ^{ns}	0,003279 ^{ns}	11,854799 ^{ns}	14,590638 ^{ns}
Média		4,1560	0,1691	0,1935	5,5652	10,8721
CV (%)		65,77	48,02	29,58	61,87	35,13

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade;

^{ns} F não significativo ao nível de 5%. NITR: Nitrato (mg g⁻¹), NR: nitrato redutase foliar (µmol de NO₂- h⁻¹ g⁻¹ MF), GS: glutamina sintetase (λ-GH h⁻¹ mg⁻¹ MF), AAS: aminoácidos (µmol g⁻¹ MF), PROT: proteínas (mg g⁻¹ MF).

Tabela 3- Quadrados médios para concentração de nitrato redutase (NRR) e concentração de prolina (PROL), nas raízes.

FV	GL	Quadrados Médios	
		NRR	PROL
N	1	1055,103874*	452,735730*
PEG	3	53,044909*	606,65123 ^{ns}
Variedades	3	84,369073 ^{ns}	44,085884 ^{ns}
Bloco	1	56,553220 ^{ns}	163,777606 ^{ns}
N*PEG	3	64,649843 ^{ns}	28,120723 ^{ns}
N*VAR	3	68,323396 ^{ns}	17,041925 ^{ns}
PEG*VAR	9	64,702452 ^{ns}	59,243222 ^{ns}
N*PEG*VAR	9	99,428153 ^{ns}	31,545721 ^{ns}
ERRO	31	47,562847 ^{ns}	33,333668 ^{ns}
Média		15,1559	7,8716
CV (%)		45,50	73,35

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade;

^{ns} F não significativo ao nível de 5%. NRR: nitrato redutase raízes (nmol de NO₂- h⁻¹ g⁻¹ MF), PROL: prolina (μmol g⁻¹ MF).