

ATIVIDADE DIÁRIA DA REDUTASE DO NITRATO E GLUTAMINA SINTETASE EM CAFEIEIRO ARÁBICA

José Laércio FAVARIN¹, José A. Fernandes NETTO², Luiz Antonio GALLO³, Paula Rodrigues SALGADO⁴, Marcos Silveira BERNARDES⁵, José Laércio Favarin JUNIOR⁶, Fabiana Taveira CAMARGO⁷

¹ Professor Dr. Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, USP, ² Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, ³ Professor Dr. Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, USP, ⁴ Doutoranda na área de Fitotecnia da ESALQ, USP, ⁵ Professor Dr. Departamento de Produção Vegetal da ESALQ, USP, ⁶ Aluno de graduação da Universidade Federal de Lavras, ⁷ Mestranda na área de Fitotecnia da ESALQ, USP

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em mudas de *Coffea arabica* L cv Obatã IAC 1669-20. O experimento foi conduzido no Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, USP. Para a realização do experimento adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos: T1 (100% de luz) e T2 (50% de luz) e cinco repetições. As determinações das atividades enzimáticas foram feitas às 07:00 h; 12:00 h; 17:00h e 22:00 h, bem como dos atributos ecofisiológicos: radiação fotossinteticamente ativa; condutância estomática; fotossíntese líquida; transpiração e proteína total solúvel. O nível de exposição à luminosidade altera a atividade da redutase do nitrato, cujo valor foi menor nas plantas a pleno sol às 12:00 h e 17:00 h. Ao longo do período luminoso, independentemente do nível de exposição à luminosidade, decresceu a atividade da glutamina sintetase. A disponibilidade de amônio proveniente da ação da **RN** no período noturno elevou a atividade da **GS**, enquanto a fotorrespiração, por hipótese, forneceu o substrato para a atividade dessa enzima (**GS**) nas plantas a pleno sol ao meio dia. No cafeeiro a fotorrespiração proporciona, por hipótese, a inibição da redutase do nitrato em resposta a produção de glutamina por meio da atividade da glutamina sintetase.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., condutância estomática, taxa de fotossíntese líquida, taxa de transpiração, radiação fotossinteticamente ativa

ACTIVITY OF THE NITRATE REDUCTASE AND GLUTAMINE SYNTHETASE ENZYMES IN ARABIC COFFEE

Abstract:

The purpose of this research was to evaluate the activity of the nitrate reductase enzymes (NR) and glutamine synthetase (GS) in *Coffea arabica* L cv Obatã IAC 1669 – 20 seedlings. The experiment was carried out in a greenhouse in the Biological Science Department of the Superior School of Agriculture “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo. The completely randomized experimental design was used for the experiment with two treatments: T1 (100% of light) e T2 (50% of light), each one with five replicates. The enzymatic activities and eco-physiological attributes determinations such as photosynthetically active radiation, stomatal conductance, net photosynthesis rate, transpiration rate and total soluble protein were determined at 7:00 AM, 12:00 AM, 5:00 PM and 10:00 PM. The level of radiation exposition changes the nitrate reductase activity, whose the value was smaller in plants under the strongest sun at 12:00 AM and 5:00 PM. The availability of ammonium provided by **NR** during dark period, independently of the treatments, increase the **GS** activity, while photorespiration, hypothetically, supplied the substrate (NH_4^+) to the **GS** action in plants under the strongest sun at 12:00 AM. The intense photorespiration in coffee plants provides, hypothetically, the **NR** inhibition in response to the glutamine production through the **GS** activity.

Key words: *Coffea arabica* L., stomatal conductance, net photosynthesis rate, transpiration rate, photosynthetically active radiation

Introdução

Diferente da maioria das espécies, nas plantas jovens de café a atividade da redutase do nitrato (**RN**) é maior no escuro, diminuindo sua ação na presença de luz (Alves et al., 1985; Cordeiro et al., 1984; Carvalho, 1975).

A assimilação do amônio liberado durante a fotorrespiração em plantas C_3 representa cerca de 90 % do fluxo por meio da rota GS/GOGAT nas folhas (Stitt et al., 2002). A menor atividade da enzima **RN** em plantas jovens de café cultivadas a pleno sol e, conseqüentemente, o acúmulo de nitrato, poderiam estar relacionados com o aumento da assimilação do amônio proveniente da fotorrespiração por meio das atividades das enzimas glutamina sintetase ou GOGAT.

São escassas as informações sobre a atividade da glutamina sintetase (**GS**) em mudas de café, bem como não foi devidamente explicado o comportamento diferencial da redutase do nitrato em cafeeiro comparado à maioria das plantas.

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar as atividades enzimáticas da redutase do nitrato (**RN**) e da glutamina sintetase (**GS**) em mudas de café cultivadas a pleno sol (100 % de luz) e a meia sombra (50 % de luz) em função dos atributos ecofisiológicos.

Material e Métodos

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia Agrícola do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, USP em Piracicaba, SP.

As mudas de café arábica (cv. Obatã IAC 1669-20) com doze meses de idade, foram conduzidas a pleno sol (T1: 100 % luz) e a meia sombra (T2: 50 % de luz), nas quais se efetuou as determinações das atividades das enzimas redutase do nitrato – **RN** ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) e da glutamina sintetase – **GS** ($\mu\text{M de } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$).

A determinação da atividade da redutase do nitrato foi feita com intervalo de 5 h, efetuadas às 7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 h. Esse procedimento foi adotado para permitir a comparação da ação enzimática nas diferentes condições de luminosidade (pleno sol e meia sombra) durante o período luminoso e a noite.

As variáveis ecofisiológicas: condutância estomática (**gs**, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração (**E**, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fotossíntese líquida (**A**, $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e radiação fotossinteticamente ativa (**PAR**, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram medidas nas folhas que se determinou a **RN**. Esse procedimento foi adotado para permitir a comparação da ação enzimática nas diferentes condições de luminosidade do experimento (T1: pleno sol e T2: meia sombra) ao longo do período luminoso, em função da variação diária da irradiância e dos referidos atributos ecofisiológicos.

A determinação de proteína total solúvel (**PTS**) foi feita conforme a metodologia de Bradford (1976), usando extratos preparados com o tampão TRIS, cujos resultados foram expressos em mg g^{-1} de matéria fresca (MF).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos: T1 - plantas a pleno sol (**PS**) e T2 - plantas a meia sombra (**MS**) e cinco repetições. Cada repetição era constituída por uma planta por vaso, perfazendo 20 plantas por tratamento, em razão das avaliações serem realizadas em conjuntos de cinco plantas em quatro horários diferentes.

Resultados e Discussão

A atividade da enzima redutase de nitrato determinada a pleno sol decresceu ao longo do período luminoso (Figura 1), corroborando resultados anteriores obtidos por Alves et al. (1985) e Queiroz et al. (1993). As médias obtidas para a atividade da **RN** às 7:00 h nas plantas a pleno sol ($0,82 \mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) foram 70 % e 82 % superiores àquelas determinadas às 12:00 h ($0,26 \mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) e às 17:00 h ($0,15 \mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$), respectivamente (Figura 1). A atividade dessa enzima (**RN**) às 22:00 h mais que duplicou, uma vez que chegou a $1,63 \mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$ em relação ao valor determinado às 7:00 h.

Nas plantas a meia sombra a atividade da **RN** alternou ao longo do dia (7:00 h às 17:00 h) apresentando uma tendência diferente do que foi observado em relação à atividade dessa enzima nas plantas expostas ao sol. Nas plantas conduzidas sob 50 % de luz evidenciou uma atividade superior da **RN** às 12:00 h ($0,66 \mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$).

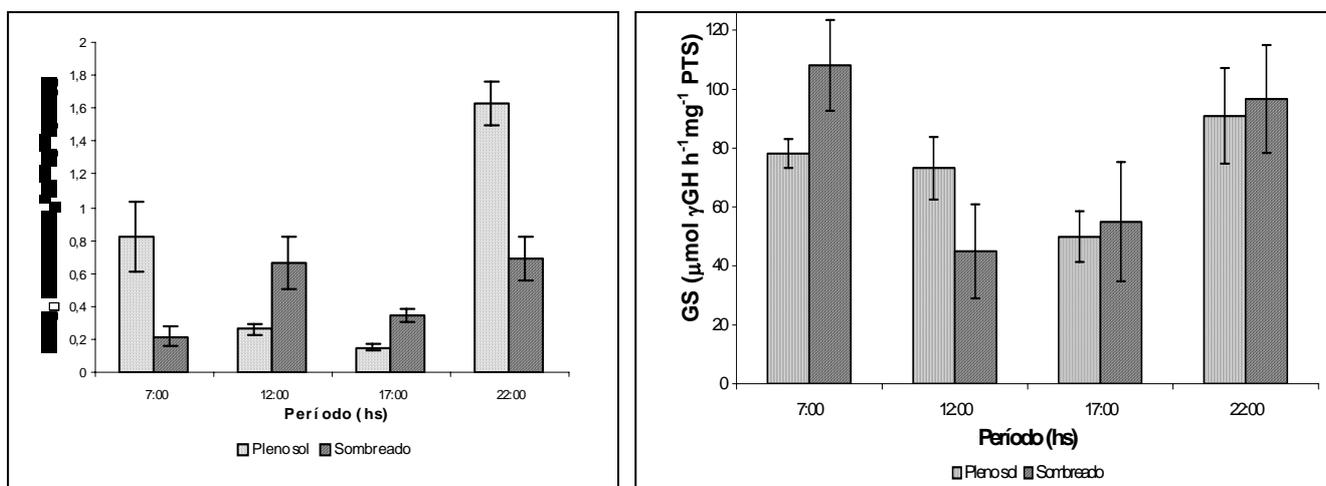


Figura 1 – Média da atividade da redutase do nitrato e glutamina sintetase em mudas de *Coffea arabica* L. cv Obatã IAC 1669-20 cultivadas a pleno sol e a meia sombra às 7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 h

A atividade da **RN** nas plantas a pleno sol às 7:00 h foi, em média, 73 % maior ($p < 0,05$) em relação àquela determinada nas plantas a **MS** (50 % de luz). Este comportamento pode ser explicado observando as medidas da taxa de fotossíntese e condutância estomática (Tabela 1). Na avaliação feita às 7:00 h, em razão da baixa luminosidade ($45 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - **MS**), as médias da fotossíntese líquida ($3,50 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e da condutância estomática (**gs**: $0,04 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) são inferiores àsquelas obtidas nas plantas expostas ao sol (**A**: $8,86 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e **gs**: $0,15 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), contribuindo para a menor atividade da **RN** ($0,335 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF), uma vez que esta enzima é pouco ativa quando diminui a concentração de CO_2 (Kaiser & Huber, 2001). Se a atividade da **RN** é afetada pela quantidade de gás carbônico, a mesma ocorreu devido à resistência estomática ao gás, sendo 3,5 vezes superior à resistência nas plantas exposta ao sol.

A tese de que a atividade da **RN** (Figura 1) depende da fotossíntese pode ser corroborada por meio das avaliações efetuadas às 7:00 h nas plantas a pleno sol, bem como nas plantas a meia sombra às 12:00 e 17:00 h, uma vez que a atividade dessa enzima acompanhou a taxa de fotossíntese líquida (Tabela 1). Entretanto, às 22:00 h os valores da **RN** também foram elevados, mesmo na ausência da fotossíntese, pois os estômatos das plantas estão fechados à noite. Nesta condição, o CO_2 é liberado do íon bicarbonato (HCO_3^-) pela ação da anidrase carbônica (Kaiser & Huber, 2001). Para Bachmann et al. (1995) a **RN** pode ser ativada no escuro pelo fornecimento de açúcar às folhas fato que pode explicar a atividade da referida enzima às 22:00 h. Provavelmente, parte das reservas produzida na luz são usadas para ativar a **RN** no escuro (Carelli et al., 1990; Queiroz et al., 1993).

A atividade da **GS** diferiu entre as plantas expostas ao sol e a meia sombra às 7:00 h e 12:00 h (Tabela 1). Nas plantas a pleno sol a atividade da **GS** foi da ordem de $78,1 \mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$, em média, 28 % inferior àquela obtida nas plantas sombreadas ($108,1 \mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$).

A elevada atividade da **GS** nas primeiras horas do período luminoso pode estar relacionada com a atividade da **RN** no período noturno antecedente, uma vez que o cafeeiro, apresenta grande atividade da R-NO_3^- no escuro (Carelli et al., 1990), apresentando um pico no final da noite (Queiroz et al., 1993). Com isso, o amônio formado nesse período seria reassimilado pela **GS** em compostos orgânicos, para evitar prejuízos às células.

Os resultados da atividade da **GS** às 17:00 h e 22:00 h não diferem entre as plantas conduzidas a pleno sol ou expostas a meia sombra (Figura 2). Verifica-se, entretanto, uma tendência crescente da atividade dessa enzima nesse período (17:00 às 22:00 h), independentemente, do grau de exposição à irradiância, passando, em média, de $49,9 \mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$ para $90,9 \mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$ nas plantas do tratamento a pleno sol e de $55,0 \mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$ para $96,6 \mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$ naquelas mantidas sob meia sombra (Figura 1).

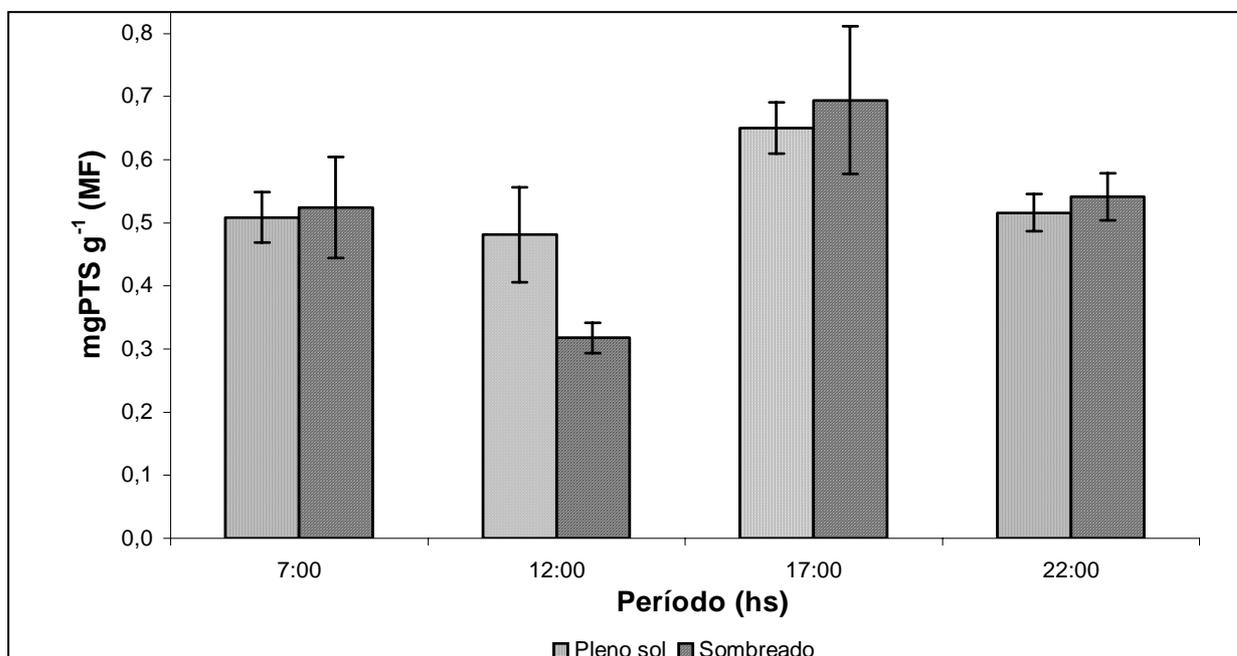


Figura 2 – Média de proteína total solúvel (**PTS**) em mudas de *Coffea arabica* L. cv Obatã IAC 1669-20 cultivadas a pleno sol e a meia sombra às 7:00 h, 12:00 h, 17:00 h e 22:00 h

A flutuação da atividade da **GS** pode ser explicada pela sua dependência da quantidade de luz e da própria atividade da **RN** (Tjaden et al., 1995). No período das 17:00 às 22:00 h foi constatado um aumento na atividade da **RN** de $0,15 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF para $1,63 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF nas plantas expostas à luz e de $0,35 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF para $0,69 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF naquelas à meia sombra (Figura 1). Entretanto, os resultados obtidos no período da

manhã não corroboram as afirmações de Tjaden et al. (1995), pois às 7:00 h verificou maior atividade da **GS** 108,1 $\mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$ nas plantas à meia sombra e menor atividade da **RN** (Figura 1), enquanto às 12:00 h a maior ação dessa enzima (**GS**) ocorreu nas plantas expostas ao sol (73,2 $\mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$) e menor atividade da **RN**. Portanto, a atividade da glutamina em cafeeiro não pode ser explicada apenas pela luminosidade e atividade da **RN**. A ação da R-NO_3^- no escuro, bem como a fotorrespiração no cafeeiro, independentemente da saturação do aparelho fotossintético das plantas expostas ao sol, evidenciado pelos valores da **GS** às 22:00 h (90,9 $\mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$) e às 12:00 h (73,2 $\mu\text{M } \gamma\text{-GH h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PTS}$) fornecem, provavelmente, substrato à atividade da enzima (**GS**).

A atividade da **RN** às 12:00 h apresentou, também, diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos estudados, sendo que, sob sombreamento, a atividade da **RN** foi, aproximadamente, 2,5 vezes maior que àquela obtida nas plantas ao sol (Figura 1). No entanto, os valores obtidos para a atividade da **GS** foram maiores ($p < 0,05$) nas plantas expostas à radiação solar em comparação às plantas a meia sombra. Esse comportamento da atividade da **GS**, provavelmente, está relacionado com a presença de amônio proveniente da fotorrespiração, visto que o cafeeiro a pleno sol (12:00 h) encontrava-se sob intensa radiação fotossinteticamente ativa (1.302 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Nesse horário (12:00 h), a combinação da baixa condutância estomática (0,06 $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), menor transpiração (3,90 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e fotossíntese líquida (7,60 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), associado a reduzida atividade da **RN** (0,26 $\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), comparativamente às médias verificadas nas plantas a meia sombra, não justificam a elevada atividade da **GS** determinada às 12:00 h. Esse comportamento pode ser explicado pelo aumento da disponibilidade de amônio proveniente da fotorrespiração nas plantas expostas ao sol, superando a rota normal, quando o substrato (NH_4^+) advém da atividade da **RN**. Outra explicação pode ser dada por meio do teor de **PTS** determinado às 12:00 h, o qual diferiu ($p < 0,05$) entre as plantas a pleno sol (0,48 $\text{mg PTS g}^{-1} \text{ MF}$) e a meia sombra (0,32 $\text{mg PTS g}^{-1} \text{ MF}$) (Figura 2), cuja diferença estaria relacionada com o decréscimo na atividade da **GS** (Figura 1).

Tabela 1. Média da taxa de fotossíntese líquida (**A**), condutância estomática (**gs**), taxa de transpiração (**E**) e radiação fotossinteticamente ativa (**PAR**) nas mudas de *Coffea arabica* L. cv Obatã IAC 1669-20 cultivadas a pleno sol (**PS**) e a meia sombra (**MS**).

Variáveis	7:00 h		12:00 h		17:00 h	
	PS	MS	PS	MS	PS	MS
A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	8,86a ¹	3,50b ¹	7,60b ¹	12,08a ¹	6,38b ¹	11,64a ¹
gs ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,15a ¹	0,04b ¹	0,08b ²	0,21a ²	0,05 ^{ns}	0,06 ^{ns}
E ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	1,37a ¹	0,50b ¹	3,90b ¹	7,80a ¹	1,87 ^{ns}	1,12 ^{ns}
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	90	45	1.302	616	450	220

¹significativo a 1 % de probabilidade, ²significativo a 5 % e ^{ns}não significativo

Conclusões

O nível de exposição à luminosidade altera a atividade da redutase do nitrato, cujo valor foi menor nas plantas a pleno sol às 12:00 h e 17:00 h.

Ao longo do período luminoso, independentemente do nível de exposição à luminosidade, decresceu a atividade da glutamina sintetase.

A disponibilidade de amônio proveniente da ação da **RN** no período noturno, elevou a atividade da **GS**, enquanto a fotorrespiração, por hipótese, forneceu substrato para a atividade dessa enzima (**GS**) nas plantas a pleno sol ao meio dia. No cafeeiro a fotorrespiração proporciona, por hipótese, a inibição da redutase do nitrato em resposta a produção de glutamina por meio da atividade da **GS**.

Referência Bibliográfica

- Alves, J.D.; Cordeiro, A.T.; Rena, A.B. Relações entre fotossíntese, resistência difusiva e variação circadiana da redutase do nitrato em *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 12., Caxambu, 1985. **Resumos**. Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1985. p.142-145.
- Bachmann, M.; McMichael, R.N.; Huber, J.L. et al. Partial purification and characterization of a calcium – dependent protein kinase and an inhibitor protein required for the activation of spinach leaf nitrate reductase. **Plant Physiology**, v.108, p.1083-1091, 1995.
- Carelli, M.L.C.; Fahl, J.L.; Magalhães, A.C. Redução de nitrato em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de luz e de nitrogênio. **Bragantia**, v.49, n.1, p.1-9, 1990.

- Carvalho, F. Estudo da atividade da redutase do nitrato em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cultivadas a meia sombra e a pleno sol sob as formas nítrica e amoniacal de adubação nitrogenada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 3. Curitiba, 1975. **Resumos**. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1975. p.208-210.
- Cordeiro, A.T.; Rena, A.B.; Mendes, L.F. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens e adultas de *Coffea arabica* L., à luz e na obscuridade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PSQUISAS CAFEEIRA, 11., Curitiba, 1984. **Resumos**. Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1984. p.77-79.
- Kaiser, W.M.; Huber, S.C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiology relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.363, p.1981-1989, 2001.
- Queiroz, C.G.S.; Rena, A.B.; Cordeiro, A.T.; Alves, J.D. Ritmo diurno na atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**. v.28, p.787-795, jul. 1993.
- Stitt, M.; Muller, C.; Matt, P. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.959-970, 2002.
- Tjaden, G.; Edwards, J.W.; Coruzzi, G.M. *cis* elements and *trans*-acting factors affecting regulation of a non-photosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant Physiology**, v. 108, p.1109-1117, 1995.