

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA REDUTASE DO NITRATO EM CAFEIROS SOMBREADO E A PLENO SOL

Carmem L. LEMOS¹, E-mail: lemoscarmem@yahoo.com.br; Sylvana N. MATSUMOTO²; Marcos A. F. SANTOS⁴; Renato A. COELHO³; Maycon M. C. GUIMARÃES⁴; Jessé M. LIMA⁷; Joice A. BONFIM⁵; Daniela H. FARIAS⁵; Fábio R.C.F. CÉSAR⁶; Germano S. ARAÚJO³

¹Discente do Programa de Pós graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Bolsista do PNP&D/ Café, ² Professora, DFZ - UESB, ³ Bolsista FAPESB, ⁴ Bolsista UESB, ⁵ Bolsista Pibic/CNPq, ⁶ Estagiário voluntário do Laboratório De Fisiologia Vegetal, Bolsista do PNP&D/ Café⁷.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi investigar as flutuações diurnas na atividade da redutase de nitrato em cafeeiros adulto (*Coffea arabica* L.), sombreado e a pleno sol, na parte aérea, nos terços médio e superior. A determinação da atividade da redutase de nitrato foi feita às 06:00 h, 12:00 h e 18:00 h. Observou-se que a atividade enzimática da redutase de nitrato alternou ao longo do período luminoso (6:00 h às 18:00 h), tanto no sistema sombreado quanto no sistema a pleno sol. Observou-se também maior atividade da enzima às 12:00 h no terço superior tanto do sistema pleno sol quanto do sistema sombreado.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., nitrato, sombreado, pleno sol, luminoso

ACTIVITY ENZYMATIC OF THE NITRATE REDUCTASE OF IN COFFEE TREES SHADING AND THE FULL SUN

Abstract:

The aim of this work was investigate the diurnal fluctuations of the nitrate reductase activity of coffee fields (*Coffea arabica* L.), shading and at full sun, in the upward and middle part of a plant. The determination of the activity of the nitrate reductase was done at 06:00 h, 12:00 h and 18:00 h. It was observed that the activity of the nitrate reductase alternated throughout day light period (6: 00 h to 18:00 h), in shading system as well as in full sun system. A major activity of the enzyme was verified at 12:00 h in upward of plant at full sun and the same behavior was observed in shading system.

Key words: *Coffea arabica* L., nitrate, shading, full sun, luminous

Introdução

O café é originário de florestas caducifólias da Etiópia e Sudão (Boulay et al., 2000); é, portanto, uma espécie adaptada à sombra.

No Brasil as cultivares de café foram selecionadas a pleno sol, por isso as mesmas apresentam, potencialmente, adaptações à elevada irradiância (DaMatta & Rena, 2002). Contudo, a baixa relação entre as clorofilas a e b, características das plantas de sombra, tem sido mantida nas folhas expostas ao sol (Fahl et al., 1994; DaMatta & Maetri, 1997). Por isso, o cafeeiro pode ser considerado como uma planta facultativa de sombra, com alta plasticidade às variações de irradiância (DaMatta & Rena, 2002).

A enzima redutase de nitrato (RN) está localizada, primariamente, no citossol das células corticais da epiderme da raiz e nas células mesofílicas da parte aérea (Ruffy et al., Vaughn & Campbell, 1988).

A enzima (RN) catalisa o primeiro passo enzimático da assimilação de nitrogênio pelas plantas superiores por meio da redução do nitrato (NO₃) a nitrito (NO₂) (Oaks, 1994; Yaneva et al., 2000).

Diferente da maioria das espécies vegetais, nas plantas jovens de café as maiores atividades da RN foliar ocorrem durante o período escuro, diminuindo sua ação na presença de luz (Miranda Neto, 1970; Faleiros et al., 1975; Carvalho, 1975; Cordeiro et al., 1984; Alves et al., 1985). Este comportamento favorece o crescimento das mudas de café, em particular, quando as mesmas são expostas a 50% de luz, conforme estudos realizados por Silveira & Maetri (1973) e Paiva (2001). Esta é, certamente, a razão porque as mudas de café são formadas em viveiros expostas a 50% de luz (meia sombra). O aumento da atividade enzimática observada logo após o período de luz, poderia ter sido causado pela maior disponibilidade de ATP e NAD(P)H no citoplasma, decorrente da fotossíntese (Alves et al., 1985). Todavia, o decréscimo da atividade da redutase do nitrato ainda no período luminoso parece não estar relacionado com a fotossíntese corrente (Alves et al., 1985). Entretanto, os fatores que induziram o estímulo na atividade da redutase do nitrato nas folhas no escuro em sistemas agroflorestais e a pleno sol em cafeeiro adulto precisam ser investigados, sugerindo pesquisas sobre a disponibilidade de nitrato ao sítio de ação da enzima.

Para Kaiser & Huber (2001) a luz não é um sinal direto para a atividade da RN, pois mesmo sob intensa e contínua luminosidade a RN é inativa quando falta CO₂, indicando que a fotossíntese é requerida para a sua ativação.

Considerando a necessidade desse gás para a ação da enzima pode-se admitir, por hipótese, que as causas que afetam a entrada do CO₂, como a abertura estomática, variável com a capacidade da planta de manter a turgidez, afetaria a eficiência da RN. O cafeeiro arábica, em razão das condições climáticas relativas à sua origem, pode apresentar menor atividade enzimática (RN) no período luminoso, devido à baixa condutividade hidráulica dessa espécie, característica de plantas de sub-bosque que se desenvolvem sob elevada umidade relativa do ar (Andrade Netto, 2005).

A contribuição relativa da raiz e da folha no processo de redução do nitrato varia significativamente em função da hora do dia, pois a atividade do nitrato nesses órgãos ocorre tanto à luz quanto no escuro (Aslam et al., 1979; Ruffly et al., 1982; Claussen, 1986), embora nas folhas ocorra mais rapidamente à luz (Aslam & Huffaker, 1982; Reed et al., 1983; Shivashankar & Rajgopal, 1983).

O estímulo da atividade enzimática à luz tem sido associado à maior disponibilidade de ATP (Sawhney et al., 1978), de NADH (Klepper et al., 1971), de nitrato (Beever et al., 1965) e de carboidratos (Aslam et al., 1973). No entanto, a luz por si parece não ser um requerimento absoluto para redução do nitrato, uma vez que níveis consideráveis de atividade enzimática podem ocorrer nos tecidos, com um suprimento adequado de carboidratos (Guerreiro et al., 1981). Desta forma, carboidratos armazenados aparentemente suprem a energia requerida para a indução e a redução do nitrato no escuro (Claussen, 1986).

Este estudo teve como objetivo investigar as flutuações diurnas na atividade da redutase de nitrato em cafeeiros sombreado e a pleno sol, na parte aérea.

Material e Métodos

A coleta das folhas dos terços médio e superior foi realizada em Janeiro de 2007, no município de Barra do Choça, Bahia situada a latitude 14° 51' Sul e longitude 41° 08' oeste e com altitude média de 860 m. No sistema agroflorestal os cafeeiros estão dispostos em espaçamento de 3,0 X 1,0 m e estão associados à seguinte espécie arbórea: ingá (*Inga edulis*) e abacateiro (*Persea americana*), dispostas em espaçamento irregular. No sistema Café a pleno sol (solteiro): é constituído apenas pelo cafeeiro (*Coffea arabica* L.), variedade Catuaí, no espaçamento de 3,0 x 1,0 m.

A atividade *in vivo* da redutase de nitrato foi determinada de acordo com a metodologia modificada por Queiroz et al. (1991), com intervalo de 6 h entre as avaliações, realizadas às 6:00 h, 12:00 h e 18:00 h. Este procedimento foi adotado para permitir investigar as flutuações diurnas na atividade da redutase de nitrato nos diferentes sistemas.

Amostras de discos foliares de 0,5 cm de diâmetro, com peso aproximado de 100 mg de massa, foram retirados com auxílio de um perfurador, os quais foram colocados em tubo de ensaio contendo 5 ml do meio de incubação. Esse meio era composto de tampão fosfato (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) 100mM, pH7,5, KNO₃ 200mM. O conteúdo dos frascos contendo as amostras foliares foi, imediatamente após a introdução das mesmas, submetido a vácuo (650 mmHg) por 1 minuto, após o que se introduziu o ar, e novamente, vácuo por 2 minutos, com a finalidade de aumentar a penetração da solução nos tecidos. Em seguida, os tubos de ensaio contendo o material vegetal foram incubados em banho – maria a 30°C por 1 hora ao abrigo da luz, envoltas com folha de alumínio. A quantificação do nitrito foi feita pela reação com 1 ml de sulfanilamida a 1% em HCl 3N e, a seguir, adicionou-se 1 ml de diclorodrato de N-1-naftiletileno diamina 0,02%. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm, sendo a atividade enzimática de nitrito produzida, comparando os valores obtidos com uma curva padrão para esse íon, previamente estabelecida. Os resultados obtidos dessa variável foram expressos em $\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$.

O experimento foi realizado em campos experimentais, utilizando dois tratamentos: T1 (Sistema agroflorestal) e T2 (Sistema a pleno sol) e cinco repetições. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Student, a 5 e 10% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A atividade da enzima redutase de nitrato (RN) determinada no sistema sombreado nos terços médio e superior esta exposto na Tabela 1. Observa-se que a atividade enzimática da redutase de nitrato alternou ao longo do período luminoso (6:00 h às 18:00 h).

Tabela 1 – Atividade enzimática da redutase de nitrato em sistema cafeeiro sombreado, nos terços médio e superior.

| Sistema | Terço | Intervalo de Coleta [$\mu\text{mol N-NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{(MF)}$] | | |
|-----------|----------|--|-------------|------------|
| | | 06:00 h | 12:00 h | 18:00 h |
| Sombreado | Médio | 0,0622 a | 0,0665 b | 0,0484 b |
| | Superior | 0,0480 a | 0,1851 a ** | 0,1079 a * |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t de Student significativo a 5% (*) e a 10% (**).

Em plantas do sistema sombreado foi observada atividade superior da **RN** durante o período luminoso, às 12:00 h no terço superior (0,1851 $\mu\text{mol N-NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboraram estudos realizados por vários autores, afirmando que a atividade da enzima, nas folhas do cafeeiro, aumenta no período de maior irradiância diária (Miranda Neto, 1970; Carvalho, 1975; Faleiros et al., 1975; Fahl et al., 1994). Segundo Andrade Netto, 2005, este comportamento pode ser explicado, em parte, pela reassimilação do nitrogênio liberado no processo fotorrespiratório cuja ocorrência pode ser inferida com base na elevada temperatura foliar 40,7° C em relação a temperatura do ar (38,8° C) verificada nas plantas a pleno sol. Apesar da introdução de árvores nos cafezais promover redução da incidência luminosa e atenuação das variações de temperatura, no presente estudo, a elevação da atividade de RN persistiu.

Quando se compara a atividade da RN nos terços médio e superior às 06:00 h, não se observaram diferenças. A baixa luminosidade incidente neste período do dia anulou as possíveis diferenças entre os estratos das plantas estudadas.

A atividade da **RN** determinada no sistema a pleno sol nos terços médio e superior está exposto na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade enzimática da redutase de nitrato em sistema cafeeiro à pleno sol, nos terços médio e superior.

| Sistema | Terço | Intervalo de Coleta $\mu\text{mol N-NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ (MF) | | |
|-----------|----------|---|----------|------------|
| | | 06:00 h | 12:00 h | 18:00 h |
| Pleno sol | Médio | 0,0600 a | 0,0798 a | 0,0775 b |
| | Superior | 0,0533 a | 0,1080 a | 0,0843 a * |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t de Student significativo a 5% (*).

As médias obtidas para a atividade da **RN** às 12:00 h nas plantas do sistema sombreado no terço superior (0,1851 $\mu\text{mol N-NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF) foi 3,8 vezes maior àquelas determinadas às 06:00 h (0,0480 $\mu\text{mol N-NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF) conforme demonstrado na Tabela 1. Enquanto que no sistema a pleno sol no mesmo horário e terço a atividade da **RN** foi duas vezes maior àquelas determinadas às 06:00 h conforme descrito na tabela 2. Observa-se também que a atividade enzimática da **RN** apresentou a mesma tendência das plantas do sistema sombreado, alternando ao longo do período luminoso (6:00 h às 18:00 h). Embora em estudos realizados por Andrade Netto, 2005, com mudas de café em ambiente totalmente controlado, foi verificado que a atividade da **RN** determinada a pleno sol decresceu ao longo do período luminoso, convém salientar que quando se compara essa variável entre trabalhos realizados, devem se considerar alguns fatores que afetam os processos fisiológicos dos cafeeiros, tais como condições de clima (temperatura e radiação), condições do experimento (vaso ou campo), idade da planta, genótipo e sua adaptabilidade ao clima local, tipo de sombreamento (natural ou artificial), espécie utilizada e densidade de sombreamento (Carreli et al, 1999).

Portanto nas horas mais quentes do dia, maior umidade relativa, como ocorre em sistemas arborizados, parece acarretar maior abertura estomática, especialmente quando o suprimento hídrico do solo, for limitante (Tesda & Kumar, 1978). Com efeito, o estômato do cafeeiro pode responder às variações na demanda evaporativa independente do status hídrico foliar (Barros et al. 1997; Pinheiro, 2004; Tausend et al., 2000), contribuindo para uma maior atividade enzimática no sistema sombreado.

| Sistema | Terço | Intervalo de Coleta $\mu\text{mol N-NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ (MF) | | |
|-----------|----------|---|----------|-------------|
| | | 06:00 h | 12:00 h | 18:00 h |
| Sombreado | Superior | 0,0480 a | 0,1851 a | 0,1079 a ** |
| Pleno Sol | | 0,0533a | 0,1080 a | 0,0843 b * |
| Sombreado | Médio | 0,0622 a | 0,0665 a | 0,0484 b |
| Pleno Sol | | 0,0600 a | 0,0798 a | 0,0775 a * |

Tabela 3 – Atividade enzimática da redutase de nitrato em sistema cafeeiro sombreado, nos terços médio e superior.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t de Student , significativo a 5% (*) e a 10%.(**).

A comparação da atividade da **RN** no mesmo terço em sistemas sombreado e a pleno sol está exposto na Tabela 3. Quando se compara a atividade da **RN** entre sistemas tanto no terço superior quanto no terço médio às 18:00 h verificou-se diferenças. Folhas mais expostas a radiação podem ser morfológicamente diferentes das folhas menos expostas de uma mesma planta. Ao ser analisado o terço superior da planta, maior atividade da RN foi observada no sistema sombreado em relação aos cafeeiros mantidos a pleno sol. Para o estrato superior da planta, a restrição da radiação luminosa promovida

pela presença das árvores condicionou um microclima favorável à atividade da enzima. Comportamento divergente foi verificado no terço médio, ocorrendo maior atividade da RN nos cafeeiros mantidos a pleno sol.

Conclusões

A restrição de luz no terço médio da planta mantida no sistema sombreado foi mais intensa, devido ao efeito adicional do auto-sombreamento; tal limitação resultou em redução à atividade da RN. A relação entre o nível de luminosidade e a atividade da RN tem sido discutida em muitos estudos sobre cafeeiros, em condição de cultivo controlada. Os resultados do presente trabalho ressaltam a complexidade de aplicação deste conhecimento, ao ser avaliado diferentes estratos de uma planta adulta, em condição de campo.

Referências Bibliográficas

Alves, J.D.; Cordeiro, A.T.; Rena, A.B. (1985) Relações entre fotossíntese, resistência difusa e variação circadiana da redutase do nitrato em *Coffea arabica* L. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS*, 12., Caxambu, 1985. Anais. Rio de Janeiro/ MMIC; IBC, 142-145.

Andrade Netto, J. F.de. (2005) Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamine sintetase em cafeeiro arábica 2005. (Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 60.

Aslam, M; Huffaker, R.C.; Travis, R. L. (1979) The interaction of respiration and photosynthesis in induction of nitrate reductase activity. *Plant Physiology*, 53:1205-1209.

Beevers, L.; Schrader, L. E.; Flesher, D.; Hageman, R. H.(1965) The role of light sun nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedling. *Plant Physiology*, 40:691-69.

Boulay, M.; Somarriba, E.; Olivier, A. (2000) Calidad de *Coffea arabica* bajo sombra de *Erythrina poeppigiana* a diferentes elevaciones en Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*, 7:40- 42.

Carelli, M. L.C.; Fahl, J .I.; Trivelin, P. C. O.; Queiroz-Voltan, R. B. (1999) Carbon isotope discrimination and gas exchange in *Coffea species* grown under different irradiance regimes. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.11,2:63-68.

Claussen, W. (1986) Influence of fruit load and enviromental factors on nitrate reductase activity and n concentration of nitrate and carbohydrates in leaves of eggplant (*Solanum melongena*) *Physiologia Plantarum*, 67:73-80.

DaMatta, F. M.; Maetri, M. (1997) Photo inibithion and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Photosynthetica*, 34:439- 446.

DaMatta, F. M.; Rena, A.B. (2002) Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In. ZAMBOLIM, *O estado da arte de tecnologias na produção de café*. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, 93-135.

Fahl, J.L.; Carelli, M. L. C. (1994) Influência do sombreado nas características fisiol[ogicas envolvidas no crescimento de espécies de coffea. In: *SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CAFÉ ADENSADO*, Londrina, 1994. Anais. Londrina: IAPAR, 289-290.

Hewitt, E. J.; Hucklesby, D. P.; Norton, B.A. (1976) Nitrate metabolism. In Bonner, J.; Varner, J. E., (Ed.). *Plant Biochemistry*. New York: Academic Press, 20:641-651.

Kaiser, W. M.; Huber, S.C. (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiology relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany*, 52:1981-1989.

Klepper, L.; Flesher, D.; Hageman, R. H. (1971) Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiology*, 48:580-590.

Paiva, L.C. Produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L) em diferentes níveis de sombreado e seus reflexos na implantação. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal de Lavras, p.61, 2001.

Resende, M. D. V.; Furlani-Junior, E.; Moraes, M. L. T. (2001) Estimativas de parâmetros genéticos e predição de valores genotípicos no melhoramento do cafeeiro pelo procedimento REML/BLUP. *Bragantia*, 60:185-193.

Sawhney, S.K.; Naik, M.S.; Nicholas, D.J.D. (1978) Regulation of NADH supply for nitrate reduction in green plants via photosynthesis and mitochondrial respiration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 81:1209-1216.

Shivashanker, S.; Rajgopal, K. (1983) Diurnal rhythm in nitrate reductase activity of *Cocos nucifera* L. leaves. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 112:181-185.

Tausend, P.C.; Meinzer, F.C.; Goldstein, G. (2000) Control of transpiration in three coffee cultivars: the role of hydraulic and crown architecture. *Trees: structure and function*, Heidelberg, 14:181-190.

Tesha, A. J.; Kumar, D. (1978) Some aspects of stomatal behaviour in *Coffea arabica* L. I. Effects of soil moisture, soil nitrogen and potassium, and air humidity. *Kenya Coffee*, Nairobi, 43:339-343.

Vicentz, M.; Moureaux, T.; Leydecker, M.T. (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal*, 3:313-324.

Yaneva, I. A.; Baydanova, V.D.; Vunkova-Radeva, R. V. (2000) Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. *Journal of Plant Physiology*, 157:495-501.