

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela candidata Maria Luiza Carvalho Carelli, e aprovada pela Comissão Julgadora.

ESTUDO DO PROCESSO DE REDUÇÃO DE NITRATO DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL E NO ESTÁDIO REPRODUTIVO DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

MARIA LUIZA CARVALHO CARELLI

Pesquisadora Científica da Seção de Fisiologia
do Instituto Agrônomo de Campinas

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO CELSO NOVAES DE MAGALHÃES

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Biologia Vegetal.

CAMPINAS - SP
1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À

Laura e Armando

Gi e Lúcio

Paula

Rafaela

Gustavo

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Professor Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães, pela excelente orientação, apoio irrestrito, incentivo e amizade.

Aos Professores Dr. Ladaslav Sodek, Drª Maria de Fátima Domingos Aleixo Pereira e Dr. Ondino Cleante Bataglia, pela revisão criteriosa na fase de pré-banca.

Ao Pesquisador Científico João Paulo Feijão Teixeira, pela colaboração nas análises químicas.

Ao Pesquisador Científico Joel Irineu Fahl, pela ajuda e valiosas sugestões no transcorrer do presente trabalho.

Aos Técnicos de Laboratório Márcia Bonatto e Luiz Antonio Leite, pela ajuda nas determinações analíticas e no cultivo das plantas.

Ao Professor Dr. Antonio Roque Dechen, pela cooperação na fase de impressão deste trabalho.

Ao Instituto Agronômico de Campinas, especialmente à Seção de Fisiologia, pelas facilidades oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Pesquisador concedida.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelos ensinamentos e pela oportunidade oferecida.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Distribuição da atividade da redutase de nitrato na planta	3
1.2. Importância da translocação de fotos- sintetizados para as raízes para a as- similação de nitrato	5
1.3. Demanda e distribuição de assimilados e nutrientes no cafeeiro	7
1.4. Objetivos	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Condições de crescimento e desenvolvi- mento das plantas	15
2.2. Determinação da atividade da reduta- se de nitrato	16
2.2.1. Efeito do pH e concentração de nitrato no meio de reação	17
2.2.2. Tempo de reação e efeito da anaerobiose	18
2.2.3. Definição da idade do tecido da raiz	18
2.3. Determinação do teor de nitrato	19
2.4. Determinação do teor de açúcares	21
2.5. Efeito da luz na atividade da redutase de nitrato	23
2.6. Absorção, translocação e redução de ni- trato em plantas deficientes em nitrogê- nio	24

2.7. Efeito do bloqueio da translocação de fotossintetizados para as raízes na atividade da redutase de nitrato das folhas e raízes	25
2.8. Avaliação da redução de nitrato em folhas e raízes durante o desenvolvimento inicial das plantas	26
2.9. Redução de nitrato em plantas adultas - Alterações ontogênicas	28
2.9.1. Atividade da redutase de nitrato nas folhas durante o ciclo produtivo das plantas	28
2.9.2. Atividade da redutase de nitrato em folhas de ramos submetidos a tratamentos de remoção parcial ou total das flores	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Padronização da metodologia para a análise da redutase de nitrato	31
3.1.1. Efeito do pH e concentração de nitrato no meio de reação	31
3.1.2. Tempo de ensaio e efeito da anaerobiose	35
3.1.3. Definição da idade do tecido da raiz	41
3.2. Efeito da luz na atividade da redutase de nitrato	42
3.3. Absorção, translocação e redução do nitrato	51
3.4. Efeito do bloqueio da translocação de fotossintetizados para as raízes na atividade da redutase de nitrato das folhas e raízes	55

3.5. Avaliação da redução de nitrato em folhas e raízes durante o desenvolvimento inicial das plantas	63
3.6. Redução de nitrato em plantas adultas - Alterações ontogênicas	75
3.6.1. Atividade da redutase de nitrato durante a fase reprodutiva	75
3.6.2. Atividade da redutase de nitrato em folhas de ramos submetidos a remoção parcial ou total das flores	83
4. RESUMO	87
5. ABSTRACT	91
LITERATURA CITADA	95

LISTA DE QUADROS

Quadro nº	Página
1	Efeito do borbulhamento de N ₂ , no meio de incubação do tecido, na atividade da redutase de nitrato "in vivo" (μ moles NO ₂ ⁻ h ⁻¹ g ⁻¹ MF) em folhas e raízes de café. Dados de 3 experimentos, para o caso das raízes (Média de 10 repetições) 38
2	Atividade da redutase de nitrato (μ moles NO ₂ ⁻ h ⁻¹ g ⁻¹ MF) e teor de nitrato (μ moles NO ₃ ⁻ g ⁻¹ MF), em diversos componentes do sistema radicular de plantas de café de várias idades (Média de 5 repetições) ... 42
3	Distribuição da atividade da redutase de nitrato entre os vários pares de folhas, enumerados a partir da base do ramo ortotrópico, em plantas de café de 21 semanas de idade, e contribuição de cada par de folhas na atividade enzimática total da parte aérea (Média de 5 repetições) 69
4	Altura do caule, número de pares de ramos plagiotrópicos e estimativa da evolução das estruturas florais durante a fase reprodutiva de plantas de café. (Média de 5 plantas) 77

LISTA DE FIGURAS

Figura nº		Página
1	Esquema do sistema radicular do cafeeiro.....	20
2	Efeito do pH do meio de reação na análise da atividade da redutase de nitrato "in vivo", em plantas de café de 5 meses de idade. Média de 4 repetições	32
3	Efeito da concentração de nitrato no meio de reação na atividade da enzima redutase de nitrato, em raízes de plantas de café de 5 meses de idade. Média de 5 repetições	34
4	Atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de plantas de café, em função do tempo de retirada das alíquotas para a determinação da quantidade de nitrato produzido. Média de 10 repetições	37
5	Efeito da luz e escuro na atividade da redutase de nitrato e no teor de nitrato, em folhas e raízes de plantas de café de 6 meses de idade	44
6	Indução da atividade da redutase de nitrato e acúmulo de nitrato em raízes e folhas de plantas de café deficientes em nitrogênio, após o fornecimento de 15 mM de nitrato	52

Figura nº		Página
7	Alterações na atividade da redutase de nitrato nas folhas e raízes, e no teor de nitrato das folhas, após o anelamento de plantas de café de 6 meses de idade. Os valores são expressos em porcentagem em relação às plantas intactas. Dados médios de 5 repetições	57
8	Acúmulo de nitrato em folhas de plantas de café deficientes em nitrogênio, intactas e com 48 horas de anelamento, após a irrigação com solução 15 mM de nitrato. Dados médios de 5 repetições	58
9	Variações nos teores de açúcares nas raízes, após o anelamento de plantas de café de 6 meses de idade. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle	61
10	Peso de matéria seca dos vários pares de folhas (enumerados a partir da base do ramo ortotrópico) durante o desenvolvimento de plantas de café. Média de 5 repetições	64
11	Área foliar dos vários pares de folhas (enumerados a partir da base do ramo ortotrópico), durante o desenvolvimento de plantas de café. Média de 5 repetições	65
12	Variações no peso de matéria seca durante o desenvolvimento de plantas de café.....	66

Figura nº		Página
13	Acompanhamento da atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento dos vários pares de folhas (enumerados a partir da base do ramo ortotrópico) de plantas de café	67
14	Atividade da redutase de nitrato nas raízes mais jovens, durante o desenvolvimento inicial de plantas de café. Dados médios de 5 repetições	71
15	Comparação entre as atividades da redutase de nitrato da folha com máxima atividade e das raízes mais jovens, durante o desenvolvimento de plantas de café, cultivadas em areia e irrigadas com solução contendo 15 mM de nitrato	73
16	Atividade da redutase de nitrato e teor de nitrato, nas folhas, durante o ciclo reprodutivo de plantas de café de aproximadamente dois anos de idade, cultivadas em solução nutritiva. Dados médios de 5 plantas	78
17	Dados climáticos referentes ao número de horas de insolação e às temperaturas máximas registradas no Centro Experimental de Campinas no dia anterior e no próprio dia de todas as determinações	82

- 18 Atividade da redutase de nitrato e teor de nitrato nas folhas de ramos de café com frutos e nas folhas de ramos que foram submetidos ao desbaste de 50% das flores, durante o período de crescimento dos frutos. O tempo zero corresponde à época da florada principal, quando foi efetuado o tratamento de remoção das flores 84
- 19 Atividade da redutase de nitrato e teor de nitrato nas folhas de ramos de café com frutos e nas folhas de ramos que foram submetidos ao desbaste de todas as flores, durante o período de crescimento dos frutos. O tempo zero corresponde à época da florada principal, quando foi efetuado o tratamento de remoção das flores. Dados médios de 5 repetições 86

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é considerado como o quarto elemento mais abundante na composição das plantas, depois do carbono e dos elementos da água (EPSTEIN, 1972), fazendo parte da estrutura dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e coenzimas, e participando direta ou indiretamente nos importantes processos metabólicos das células.

A alta exigência do cafeeiro em nitrogênio é um fato conhecido há muito tempo, e é acentuada com o aumento da idade da planta e principalmente com o início da produção de grãos (CATANI e MORAES, 1958). Não havendo outros fatores limitantes, a nutrição nitrogenada promove o rápido desenvolvimento da planta, o aumento das ramificações dos ramos frutíferos, o número de gemas florais, a formação abundante de folhas e, conseqüentemente, o aumento de produtividade do cafeeiro (MALAVOLTA *et alii*, 1974).

O nitrato é a forma de nitrogênio mais comumente absorvida pelas plantas superiores; as formas reduzidas de nitrogênio, presentes no solo ou aplicadas como fertilizantes, sofrem nitrificação em solos agriculturáveis (MAGALHÃES, 1975).

O nitrato absorvido pelas plantas precisa sofrer redução antes de ser incorporado em aminoácidos e proteínas. Na via de assimilação de nitrato, as duas primeiras reações, catalizadas pelas enzimas redutase de nitrato e redutase de nitrito, são controladas pela redutase de nitrato que é considerada a enzima limitante na incorporação do nitrogênio mineral em compostos orgânicos (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

Em virtude de sua elevada importância a enzima redutase de nitrato é intensivamente estudada em plantas superiores nos mais variados aspectos. Entretanto, a grande maioria desses trabalhos são efetuados em plantas anuais, sendo poucas as informações referentes a espécies perenes.

No cafeeiro, os poucos trabalhos encontrados na literatura disponível sobre o estudo da enzima redutase de nitrato abordam aspectos referentes à fertilização nitrogenada (BREALY e CARVAJAL, 1971; TALEISNIK e PACHECO, 1980), ao efeito das deficiências minerais (CARVAJAL e CAVALLINI, 1972; CAVALLINI e CARVAJAL, 1978), a tratamentos de luz e nutrição nitrogenada (FALEIROS *et alii*, 1975), ao efeito da deficiência hídrica (MEGURO e MAGALHÃES, 1983), às variações sazonais (TALEISNIK *et alii*, 1980), à influência do desbaste de flores e frutos (CARELLI *et alii*, 1984), e a estudos básicos abrangendo a padronização de metodologia e indução pela luz (MEGURO e MAGALHÃES, 1982; CORDEIRO *et alii*, 1984; CARELLI *et alii*, 1985). Em todos esses trabalhos a atividade da redutase de nitrato foi determinada apenas nas folhas. Até o presente momento, o estudo da redutase de nitrato nas raízes de plantas de café restringe-se a um resumo de um

trabalho efetuado por QUEIROZ *et alii* (1985), no qual ficou evidenciada a importância da contribuição do sistema radicular na redução de nitrato pela planta.

1.1. Distribuição da atividade da redutase de nitrato na planta

Vários trabalhos em diversas espécies de plantas demonstraram que a atividade da redutase de nitrato é baixa nas folhas em início de expansão, atinge valores máximos quando estas se tornam expandidas e declina posteriormente com a idade (AFRIDI e HEWITT, 1964; HARPER e HAGEMAN, 1972; FAIR *et alii*, 1973; SRIVASTAVA, 1975; CARELLI e MAGALHÃES, 1981; MEGURO e MAGALHÃES, 1982; OLIVEIRA, 1985). Este fato condiciona uma distribuição escalonada da atividade da redutase de nitrato na parte aérea das plantas. Assim, em plantas anuais a atividade enzimática é maior nas folhas mais apicais totalmente expandidas, declinando nos pares de folhas posicionados nas partes mais basais da planta (HARPER e HAGEMAN, 1972; FAIR *et alii*, 1973; OLIVEIRA, 1985). De modo semelhante, a distribuição da redutase de nitrato nos ramos plagiotrópicos de plantas de café apresenta as mesmas tendências observadas em plantas herbáceas (MEGURO e MAGALHÃES, 1982).

Nas raízes aparentemente ocorre uma situação análoga à observada nas folhas, pois nas regiões apicais os valores de redutase de nitrato são mais elevados do que os das regiões mais maduras (WALLACE e PATE, 1973; OAKS *et alii*, 1980).

A capacidade das raízes e da parte aérea em reduzir o nitrato absorvido varia amplamente com a espécie vegetal, e geralmente observa-se uma correlação entre os níveis de redutase de nitrato das raízes e a relação N-orgânico: N-nitrato presente na seiva do xilema (PATE, 1980). Em casos extremos, como em algumas gimnospermas, o nitrato é reduzido quase que exclusivamente nas raízes (MARTIN *et alii*, 1981; SMIRNOFF *et alii*, 1984). O outro extremo é representado pelo *Xanthium*, no qual as raízes aparentemente não apresentam atividade da redutase de nitrato (PATE, 1973).

A maioria das espécies herbáceas, incluindo importantes culturas econômicas, reduzem nitrato nas raízes e na parte aérea, mostrando uma ampla faixa de variação dentro os casos extremos mencionados anteriormente. Deste modo, em culturas como o algodão (RADIN *et alii*, 1975; RADIN, 1977), cevada (CHANTAROTWONG *et alii*, 1976; ASLAM e HUFFAKER, 1982; LEWIS *et alii*, 1982), soja (CRAFTS-BRANDNER e HARPER, 1982) e milho (HAGEMAN e FLESHER, 1960; WALLACE, 1973), os níveis de atividade da redutase de nitrato são mais altos na parte aérea do que nas raízes. Em outras espécies, como girassol (WEISSMAN, 1972), tremoço e rabanete (PATE, 1980), as raízes apresentam atividade bem maior do que a das folhas.

Grande parte das espécies lenhosas, particularmente aquelas associadas a comunidades florestais, parece reduzir a maior quantidade de nitrato nas raízes, transportando para a parte aérea altos níveis de solutos nitrogenados orgânicos (BOLLARD, 1960; KRAMER e KOZLOWSKI, 1979; PATE, 1973, 1980). Entretanto, mais recentemente, evidências baseadas na determinação de alta atividade da redutase de

nitrato nas folhas de plantas lenhosas, têm sugerido que a translocação de nitrato para as folhas, e sua conseqüente redução, podem ocorrer eficientemente nestes tecidos (ADAMS e ATTIWILL, 1982; SMIRNOFF *et alii*, 1984; SMIRNOFF e STEWART, 1985).

Em plantas de maçã e outros membros da família *Rosaceae*, foi inicialmente proposto que as raízes eram quase que totalmente responsáveis pela redução de nitrato na planta, baseando-se na alta proporção de metabólitos nitrogenados orgânicos e na quase inexistência de nitrato na seiva do xilema (BOLLARD, 1956, 1957). Posteriormente, KLEPPER e HAGEMAN (1969) demonstraram que, em adequados níveis de nitrato, a atividade da redutase de nitrato estava presente em todas as partes das plântulas de maçã, sendo que a mais alta atividade foi obtida nas folhas, quando expressa por unidade de peso de matéria fresca por hora, ou por parte da planta.

A distribuição da atividade da redutase de nitrato no cafeeiro indicou maiores taxas de redução nas raízes do que nas folhas, tanto em plantas de 6 meses, como nas de 3 meses, que se encontravam no estágio de "orelha de onça". As raízes mais jovens (secundárias) apresentaram maior atividade enzimática do que a raiz primária (QUEIROZ *et alii*, 1985).

1.2. Importância da translocação de fotossintetizados para as raízes para a assimilação de nitrato

Na planta como um todo as raízes são consideradas como sítios de consumo de assimilados (drenos) bem menos eficientes do que a parte aérea. No cafeeiro, quando a

disponibilidade de carboidratos torna-se um fator limitante, o sistema radicular é o primeiro a sofrer com a competição interna pelos fotossintetizados, diminuindo o crescimento e gerando menos energia para os processos metabólicos (CANNELL, 1975).

A assimilação de nitrato requer energia e esqueletos de carbono, que em órgãos heterotróficos como as raízes são fornecidos pela oxidação dos carboidratos fornecidos pela parte aérea.

O nitrato é um poderoso competidor pela energia disponível na raiz, de tal forma que, em plantas cultivadas em ambiente com alto nível de nitrato, o teor de açúcares e o crescimento do sistema radicular são bem inferiores aos daquelas crescidas em meio com baixo teor de nitrato ou outras formas de nitrogênio (RADIN *et alii*, 1978; ASLAM e HUFFAKER, 1982). O aumento na utilização de carboidratos pelas raízes, resultante do fornecimento de nitrato às plantas, é provavelmente devido à alta necessidade energética pela assimilação de nitrato (RADIN *et alii*, 1978; ASLAM e HUFFAKER, 1982).

Em plantas de algodão, cevada e feijão foi observado que a restrição no fornecimento de energia para as raízes, através de tratamentos de escuro, anelamento ou remoção da parte aérea, ocasiona um decréscimo progressivo na atividade da redutase de nitrato, demonstrando a importância de um contínuo fornecimento de assimilados pelas folhas para manter a redução de nitrato nas raízes (RADIN *et alii*, 1978; DEANE-DRUMOND e CLARKSON, 1979; BRETHER e HANISCH TEN CATE, 1980; ASLAM e HUFFAKER, 1982).

A absorção de nitrato pelas raízes também é dependente do teor de açúcares ou disponibilidade de energia deste tecido. De modo semelhante ao descrito anteriormente, a taxa de absorção de nitrato decresce acentuadamente com o anelamento ou excisão da parte aérea das plantas (SASAKAWA e YAMAMOTO, 1978; HANISH TEN CATE e BRETELER, 1981; SCHRADER e THOMAS, 1981). Tanto a absorção como a redução de nitrato em plantas aneladas ou excisadas são restauradas parcialmente ao nível das plantas intactas pelo fornecimento exógeno de açúcares (RADIN *et alii*, 1978; HANISH TEN CATE e BRETELER, 1981; SCHRADER e THOMAS, 1981). Entretanto, o processo de redução parece ser muito mais sensível às variações na concentração de açúcar do que a absorção e posterior translocação de nitrato para a parte aérea (RADIN *et alii*, 1978; ASLAM e HUFFAKER, 1984).

1.3. Demanda e distribuição de assimilados e nutrientes no cafeeiro

A absorção e distribuição de nutrientes (CARVAJAL *et alii*, 1969; CANNEL e KIMEU, 1971), assim como a produção e fracionamento de matéria seca no cafeeiro (CANNELL, 1971; CANNEL e HUXLEY, 1969), são intensamente influenciados pelas variações sazonais e pela presença de flores e frutos.

Plantas de café, assim como outras espécies perenes, tais como manga e *Citrus*, apresentam fluxos periódicos de crescimento das partes vegetativas (CANNELL, 1971). Em Kenya, a parte aérea do cafeeiro mostra épocas de intenso crescimento que ocorrem no início das duas estações chuvosas anuais, quando grande parte dos compostos recentemente assimilados são translocados para o ápice vegetativo da parte

aérea, que constitui então um sítio dominante de demanda de metabólitos em relação ao sistema tronco-raízes. As raízes aparentemente se constituem nos drenos preferenciais de assimilados durante os períodos secos (CANNELL e HUXLEY, 1969; CANNELL, 1971).

Com o desenvolvimento dos frutos estes passam a ser os mais poderosos drenos metabólicos, limitando a mobilização de assimilados e o crescimento das partes vegetativas das plantas (CANNELL e HUXLEY, 1971).

Em condições favoráveis, uma área foliar mínima de 20 cm^2 é necessária para manter o desenvolvimento de um fruto e um crescimento vegetativo satisfatório. Deste modo, somente 2 a 3 frutos poderiam ser adequadamente sustentados pelo par de folhas de cada nó (20 a 30 cm^2 cada folha). Na prática, entretanto, pode haver cerca de 20 frutos por nó que, conseqüentemente, retiram grandes quantidades de assimilados dos ramos laterais secundários e de folhas de outros nós mais distantes (CANNELL, 1975). O esgotamento do cafeeiro em diferentes graus, tais como a seca dos ponteiros ("die back") ou a produção bienal, são eventos atribuídos a excessiva mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos pelos frutos (CANNELL, 1971).

A demanda e distribuição de assimilados durante o ciclo produtivo de plantas de café aparentemente varia em função do estágio de desenvolvimento dos botões florais e dos frutos.

Após um período variável de dormência os botões florais de café se expandem rapidamente até à antese, apresentando um aumento de matéria seca de 500% em relação

aos botões dormentes (FREDERICO e MAESTRI, 1970; BARROS *et alii*, 1982). Estudos efetuados por BARROS *et alii* (1982) demonstraram que nesse período é necessário um rápido transporte de assimilados para os botões florais, e uma área foliar de aproximadamente $4,70\text{cm}^2$ foi necessária para a abertura de uma flor normal. Os compostos orgânicos provenientes diretamente da fotossíntese foram muito mais importantes para o desenvolvimento dos botões florais do que as reservas armazenadas nas folhas e no lenho. As gemas florais foram capazes de utilizar fotoassimilados de folhas situadas em outros nós do mesmo ramo, e constituíram um dreno metabólico bem maior do que o das gemas vegetativas.

Resultados obtidos por CANNELL e HUXLEY (1969) demonstraram que os frutos jovens em expansão têm pouco efeito na distribuição de assimilados na planta, pois nessa época há reservas disponíveis nos tecidos lenhosos. Entretanto, posteriormente, quando os recursos representados pelos carboidratos da planta atingem níveis baixos, a capacidade competitiva dos frutos passa a ser significativa.

Durante e imediatamente após a expansão dos frutos são formados os tecidos do endosperma das sementes, que atuam com poderosa prioridade sobre os demais drenos de metabólitos das plantas. Quando os frutos começam a competir com os demais sítios de consumo, as reservas presentes nos tecidos lenhosos das raízes, tronco e ramos começam a ser esgotadas. Contudo, essas reservas não são grandes quando comparadas com as necessidades dos frutos e podem ser esgotadas a um nível basal no período de 3 a 6 semanas. O endosperma, portanto, desvia progressivamente o fluxo de assimilados e N, P, K, e Mg de outros drenos. As raízes são as

primeiras a sofrerem com essa competição, crescendo menos e provavelmente gerando menos energia para a absorção de nutrientes; em segundo lugar são afetadas as gemas dos ramos laterais que cessam de crescer. As folhas jovens em expansão são os tecidos menos prejudicados pela presença de frutos, pois são os principais sítios de consumo de seus próprios assimilados (CANNELL, 1975).

A taxa de absorção de minerais pelo cafeeiro varia de acordo com a demanda da planta, ou seja, é maior quando as plantas crescem rapidamente e durante o desenvolvimento dos frutos (CANNELL e KIMEU, 1971).

Estudos sobre as variações na absorção e distribuição de macronutrientes no cafeeiro demonstraram que as exigências em minerais aumentam com a idade da planta, e que duplicam por ocasião do início da produção de grãos (CATANI e MORAES, 1958). Plantas de café suportando grande ou moderada carga de frutos absorvem todos os minerais (N, P, K, Ca e Mg) mais rapidamente do que plantas que sofreram desbaste de todos os frutos (CANNELL e KIMEU, 1971). Quando é intensa a produção de frutos, cerca de um terço do incremento em nitrogênio dos grãos é removido ou desviado de outras partes da planta (CANNELL e KIMEU, 1971).

O cafeeiro adulto, em solução nutritiva, exibe grandes mudanças na velocidade de absorção dos nutrientes, associadas com os principais estádios fisiológicos. A absorção de nitrato é maior antes da floração, no início do período de máximo crescimento e quando os frutos começam a amadurecer, diminuindo durante a floração e após a colheita. A absorção de NH_4^+ , embora quantitativamente semelhante à

absorção de NO_3^- , não apresenta diferenças tão marcantes durante os vários estádios fisiológicos (CARVAJAL *et alii*, 1969).

A redutase de nitrato é uma enzima induzível pelo substrato, sendo que o nível de atividade é, em parte, função da concentração de nitrato disponível para a planta (BEEVERS e HAGEMAN, 1969). Deste modo, a absorção diferencial de nitrato pelo cafeeiro, anteriormente citada, poderia ser um importante fator no controle da atividade da redutase de nitrato durante os vários estádios fisiológicos da planta. TALEISNIK *et alii* (1980) estudaram as variações sazonais na redutase de nitrato no cafeeiro, e obtiveram maiores níveis de atividade durante a estação seca, que coincidiu com o florescimento e maturação. Embora aqueles autores tenham associado as variações na atividade da redutase de nitrato com as condições climáticas, foi também sugerido que o estágio fisiológico das plantas, e mais precisamente a presença de frutos, poderia ter influenciado a atividade da referida enzima.

Os frutos do cafeeiro são verdes durante a fase de crescimento, possuem estômatos funcionais e podem representar 20 a 30% da superfície fotossintética total de uma planta com boa carga (RENA e MAESTRI, 1984). Há evidências de que a atividade fisiológica dos frutos é responsável por até 30% de seu ganho em matéria seca, e que a taxa fotossintética das folhas de plantas de café é controlada pela força dos drenos, dos quais os frutos são os principais representantes (RENA e MAESTRI, 1984).

CANNELL (1971) verificou que a taxa de assimilação líquida de cafeeiros com frutos é maior do que a de plantas semelhantes que sofreram tratamento de remoção dos frutos. O aumento da taxa de assimilação líquida, ocasionado pelos frutos, compensou em muito a menor área foliar dos cafeeiros produtivos, evidenciando que as folhas das plantas com frutos tem maiores taxas fotossintéticas do que aquelas sem frutos.

Em síntese, a maior absorção de nutrientes (CATANI e MORAES, 1958; CANNELL e KIMEU, 1971), assim como a maior taxa de fotossíntese (CANNELL, 1971) apresentadas pelo cafeeiro em produção, demonstram que na presença de frutos as plantas tornam-se metabolicamente mais ativas, e sugerem que possivelmente a atividade da redutase de nitrato também possa variar em função do estágio fisiológico das plantas.

1.4. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram os seguintes:

Determinar as condições ótimas para a análise "in vivo" da atividade da redutase de nitrato nas raízes, mais especificamente: a) pH e concentração de nitrato no meio de incubação; b) tempo de reação para a retirada das alíquotas para avaliar a quantidade de nitrito produzido; c) efeito da anaerobiose no meio de incubação; d) definição do componente radicular a ser analisado.

Estudar o efeito da luz na atividade da redutase de nitrato nas folhas e raízes.

Caracterizar os processos de absorção, translocação e redução de nitrato em plantas deficientes em nitrogênio.

Verificar o efeito do bloqueio na translocação de fotossintetizados para as raízes, na atividade da redutase de nitrato das folhas e raízes.

Acompanhar o desenvolvimento do processo de redução de nitrato em cada par de folhas e nas raízes, durante os primeiros meses de desenvolvimento das plantas.

Avaliar a atividade da redutase de nitrato nas folhas durante o ciclo produtivo das plantas, assim como verificar o efeito da remoção parcial ou total das flores dos ramos na atividade enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas sementes de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuai Vermelho H 2077-2-5-81, fornecidas pela Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas.

As plantas do cultivar Catuai Vermelho são bem vigorosas, com altura média de 2,0m e diâmetro da copa ao redor de 1,9m. Os internódios são curtos, a ramificação secundária abundante e o sistema radicular é bem desenvolvido. Usualmente o florescimento ocorre de setembro a novembro e a maturação dos frutos em maio-junho. A produção média de café beneficiado, em espaçamentos normais, varia de 1.500 a 1.800 Kg/ha, podendo atingir até 5.500 Kg/ha em anos de elevada produção e em espaçamentos menores. O 'Catuai Vermelho' vem mostrando ampla capacidade de adaptação, dando boas produções na maioria das regiões onde vem sendo cultivado. Seu menor porte, além de permitir maior densidade de plantio, torna a colheita mais econômica e facilita os tratamentos fitossanitários (CULTIVARES..., 1980).

2.1. Condições de crescimento e desenvolvimento das plantas

As plantas foram obtidas em casa de vegetação pelo plantio direto de sementes sem pergaminho, colocadas para germinar em areia lavada, em sacos plásticos, ou em caixas de polietileno de 56cm de comprimento, 24cm de largura e 18cm de altura, ou em germinadores de alvenaria e cimento, dependendo do tipo de experimento. As plantas em crescimento foram irrigadas alternadamente com água e solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1939), de tal forma a mantê-las em bom estado nutricional, sem entretanto causar excesso de concentração salina.

Em casos específicos, antes do início do experimento, as plantas foram transferidas da casa de vegetação para câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura ao redor de $27 \pm 4^{\circ}\text{C}$ durante o dia e $20 \pm 4^{\circ}\text{C}$ à noite. A radiação luminosa no interior da câmara, medida com aparelho LI-COR Inc. modelo L.I - 1600, foi aproximadamente $65 \text{ a } 70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas mistas MLL-250 e lâmpadas fluorescentes TLRS 40/54, na proporção de 2:1 watts, respectivamente.

Nos estudos efetuados com plantas adultas, nos quais foram analisadas somente as folhas, as plantas foram conduzidas em soluções hidropônicas. Resultados obtidos previamente mostraram que o cultivo das plantas em solução nutritiva foi inadequado para o estudo da atividade da redutase de nitrato nas raízes, que apresentaram valores excessivamente altos, provavelmente devido a contaminação microbiana.

A metodologia referente ao cultivo das plantas em solução nutritiva, assim como as particularidades inerentes a cada experimento, serão oportunamente descritas neste trabalho.

2.2. Determinação da atividade da redutase de nitrato

A atividade da redutase de nitrato, "in vivo", foi determinada pela metodologia descrita por MEGURO e MAGALHÃES (1982), com modificações, visando-se otimizar a técnica para raízes de café.

As folhas foram cortadas com furador de ro-lhas, em discos de 6mm de diâmetro, e as raízes seccionadas em pedaços de aproximadamente 10mm de comprimento. O tecido foi pesado (0,2g) e em seguida transferido para frascos de vidro contendo 5ml de solução, denominada de meio de reação, constituída por fosfato de potássio 10mM, pH 8,0, nitrato de potássio 0,1M e n-propanol a 1%. Dentro de um intervalo de tempo, variável entre 15 e 60 minutos, foram retiradas alíquotas de 0,5ml do meio de reação, que foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2ml de reagente, constituído por N-1-naftileno diamino di HCl 0,02% e sulfanilamida 1% em HCl 1,5M, na proporção de 1:1 (v/v), mais 1,5ml de água destilada. A quantidade de nitrito produzida foi determinada colorimetricamente, pela leitura da absorbância das soluções a 540nm.

Baseando-se no método previamente descrito por MEGURO e MAGALHÃES (1982) para determinação da atividade da redutase de nitrato em folhas de plantas de café, foram estabelecidas as condições ótimas para a análise enzimática

nas raízes, tais como: tempo de reação, pH e concentração de nitrato no tampão fosfato, efeito da anaerobiose através de borbulhamento contínuo de N_2 , e idade do tecido. O ensaio da atividade da redutase de nitrato nas folhas foi também otimizado com referência ao tempo de reação e efeito do borbulhamento de N_2 .

A atividade da redutase de nitrato foi determinada no par de folhas recentemente expandido e nas raízes mais jovens, e referida em micro moles de nitrito formado por hora, por grama de matéria fresca ($\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

2.2.1. Efeito do pH e concentração de nitrato no meio de reação

Esses estudos foram efetuados utilizando plantas de aproximadamente 5 meses de idade, com 2 pares de folhas, cultivadas em areia, em caixas de polietileno, em casa de vegetação. No dia anterior à determinação da atividade da redutase de nitrato, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento e irrigadas com solução nutritiva. As análises foram efetuadas após 3 horas de luz, com 4 repetições para cada tratamento.

A faixa de pH do tampão fosfato estudada foi de 6,0 a 9,0, utilizando-se uma solução 0,1M de K_2HPO_4 , e acertando-se o pH aos valores desejados com uma solução 0,1M de KH_2PO_4 .

A concentração adequada de nitrato no meio de reação para determinação da atividade da redutase de nitrato nas raízes, foi determinada testando-se 6 concentrações, que variaram de 12,5 a 400 mM de NO_3^- .

2.2.2. Tempo de reação e efeito da anaerobiose

O experimento para determinar o tempo de reação para a retirada de alíquotas, foi efetuado em plantas de 5 meses de idade, com 2 pares de folhas, cultivadas em caixas de polietileno com areia. As plantas foram colocadas em câmara de crescimento 48 horas antes das análises, que foram efetuadas após 3 horas de exposição das plantas à luz. Neste ensaio, a difusão de íons nitrito para o meio de reação foi determinada utilizando-se 10ml de tampão fosfato 0,1M, em nitrato de potássio 0,05M, e retirando-se alíquotas de 0,5ml após 15, 30, 45 e 60 minutos de reação, em tecidos de folhas e raízes.

O efeito da anaerobiose na determinação da atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes, foi estudado através do borbulhamento contínuo do meio com gás nitrogênio (N_2). Neste estudo, as plantas foram trazidas diretamente da casa de vegetação para o laboratório, e estavam com aproximadamente 4 meses de idade e mostrando 3 pares de folhas.

2.2.3. Definição da idade do tecido da raiz

Para se definir o tipo de material do sistema radicular do cafeeiro, a ser utilizado nas análises da atividade da redutase de nitrato, foram efetuadas determinações em plantas com 2, 7, 10 e 28 meses de idade, cultivadas em areia e irrigadas com solução nutritiva. Em cada idade da planta, foram selecionadas para análise dois tipos de raízes, classificadas como mais jovens, com cerca de 0,5mm de espessura, e as mais velhas, com aproximadamente 1,0mm de diâmetro.

A seguir estão descritos os vários estádios de crescimento das plantas, bem como os tipos de materiais radiculares utilizados nas análises, adotando-se a nomenclatura proposta por NUTMAN (1933), e adaptada por RENA e MAESTRI (1984), como ilustra a figura 1.

Planta com 2 meses: "Orelha de Onça"; raízes pivotante vertical, e laterais. Analisadas: pivotante vertical e laterais.

Planta com 7 meses: 9 pares de folhas no ramo ortotrópico; raízes pivotante vertical, axiais, laterais, e suporte das absorventes. Analisadas: laterais e suporte das absorventes.

Planta com 10 meses: 11 pares de folhas no ramo ortotrópico e 2 ramos plagiotrópicos; raízes pivotante vertical, axiais, laterais e suporte das absorventes. Analisadas: laterais e suporte das absorventes.

Planta com 28 meses: planta adulta, com 13 pares de ramos plagiotrópicos; raízes pivotante vertical, axiais, laterais, suporte das absorventes e absorventes. Analisadas: suporte das absorventes e absorventes.

2.3. Determinação do teor de nitrato

O teor de nitrato das folhas e raízes foi determinado de acordo com a metodologia estabelecida por GALLO

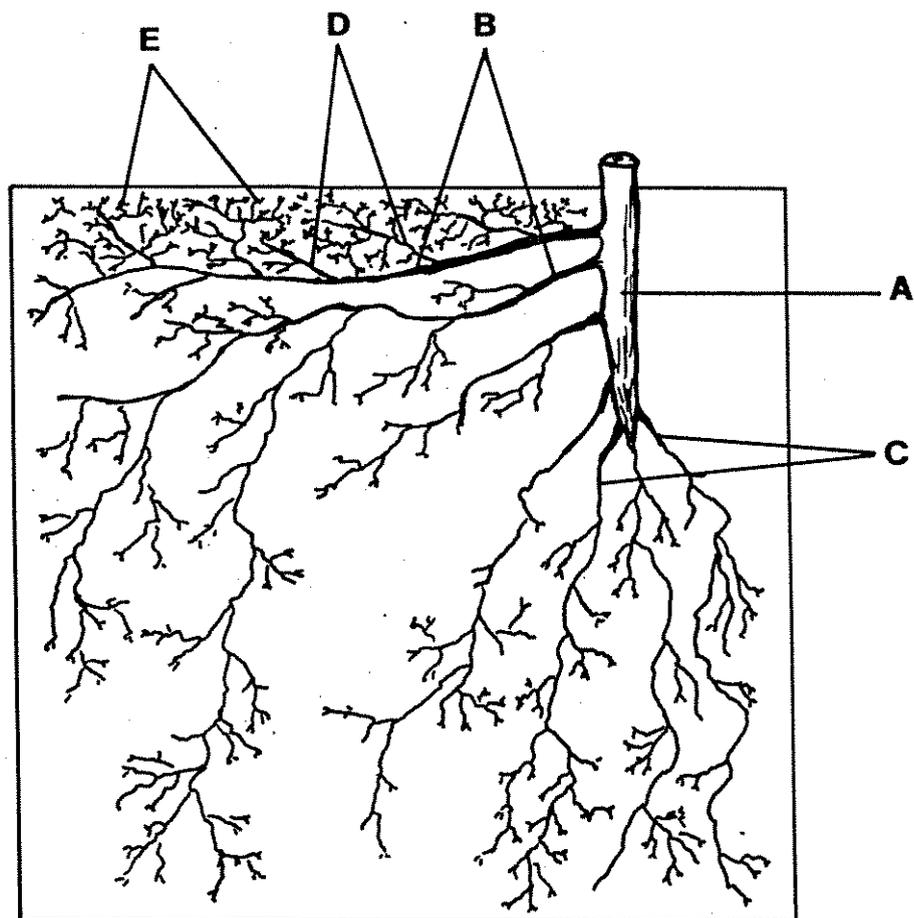


Fig. 1 - Esquema do sistema radicular do cafeeiro. A- raiz pivotante, B- lateral, C- axial, D- suporte das absorventes, E- absorventes.

e LOTT (1965). Pesa-se 0,1 g de tecido vegetal, seco e moído, e transfere-se para frascos de erlenmeyer de 50 ml. Adicionam-se 20 ml de água destilada contendo 0,5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5M. Agita-se durante 10 minutos, adiciona-se 0,04 g de Ca(OH)_2 e 0,1 g de MgCO_3 e agita-se por mais 5 minutos. Filtra-se, homogeneiza-se, pipeta-se 1 ml para copos de 50 ml e adiciona-se 1 ml de H_2O_2 30%. Cobrem-se os copos colocando-se em banho-maria à temperatura de ebulição da água para digestão durante 2 horas. Decorrido esse tempo descobrem-se os copos, que permanecem por mais uma hora no banho. Deixa-se esfriar, adiciona-se, com rotação do copo, 1 ml do reagente fenoldissulfônico (25 g de cristais de fenol em 225 ml de H_2SO_4 concentrado, aquecendo-se em banho-maria à temperatura de 95-100°C, durante 6 horas), esperam-se 10 minutos, adicionam-se 25 ml de NH_4OH 1 + 9 (1 litro de NH_4OH concentrado mais 9 litros de água destilada), agita-se a solução com bastonete de vidro e procede-se à leitura em espectrofotômetro a 420 nm.

O teor de nitrato das soluções nutritivas foi determinado do mesmo modo que as análises para as folhas e raízes, partindo-se de 2 ml de solução.

2.4 Determinação do teor de açúcares

A extração dos açúcares foi efetuada em 200 mg de amostra seca moída (40 mesh), que foi extraída com solução de etanol 70% (v/v) em tubo de centrífuga por duas vezes, segundo TEIXEIRA (1984). Após a centrifugação o sobrenadante foi evaporado, redissolvido com água destilada e transferido, com filtragem, para balão de 50 ml, completando-se o volume (I).

A hidrólise para a determinação de açúcares totais, foi efetuada de acordo com SCHMIDT-HEBBEL (1970), e descrita a seguir: tomaram-se 15 ml da solução (I) aos quais foram adicionados 1,5 ml de HCl concentrado, submetendo-se a solução a aquecimento de 67-70°C durante 5 minutos. Após, neutralizou-se com solução de NaOH e completou-se o volume em balão de 25 ml (II).

A reação de cor, ou determinação propriamente dita, foi efetuada segundo NELSON (1944).

Para a determinação de açúcares redutores partiu-se de 1 ml da amostra da solução (I) ao qual foi adicionado 1 ml do reagente A + B, em tubos de Folin-Wu, aquecendo-se em banho-maria a 95°C durante 20 minutos. Após o esfriamento dos tubos foi adicionado 1 ml do reagente C, agitando-se até cessar a formação de espuma. Completou-se o volume a 25 ml com água destilada e homogeneizou-se. A absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro a 540 nm.

Para a determinação dos açúcares totais repetiu-se o procedimento descrito para os açúcares redutores, partindo-se de 1 ml da solução (II) (hidrolizado).

O teor de sacarose foi calculado subtraindo-se o teor de açúcares redutores do teor de açúcares totais, e multiplicando-se pelo fator 0,9 (para converter os açúcares redutores em sacarose).

Reagente A: dissolver 25 g de carbonato de sódio anidro, 25 g de tartarato de potássio e amônio, 20 g de bicarbonato de sódio e 200 g de sulfato de sódio a 1000 ml de água e completar o volume.

Reagente B: dissolver 15 g de sulfato de cobre pentahidratado em 100 ml de água e adicionar 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado antes de completar o volume.

Reagente A + B: misturar os reagentes A e B na proporção de 25:1, respectivamente, imediatamente antes de usar.

Reagente C: dissolver 25 g de molibdato de amônio em 450 ml de água. Adicionar 21 ml de ácido sulfúrico concentrado. Dissolver 3 g de arseniato ácido de potássio heptahidratado em 25 ml de água e juntar à solução de molibdato-ácido sulfúrico. Homogeneizar, acondicionar em frasco escuro e deixar 2 dias à temperatura ambiente antes de usar.

2.5 Efeito da luz na atividade da redutase de nitrato

O efeito da luz na atividade da redutase de nitrato nas folhas e raízes foi estudado em plantas com 6 meses de idade, com 5 pares de folhas no ramo ortotrópico, cultivadas em sacos plásticos contendo areia, em casa de vegetação. No dia anterior ao da análise as plantas foram transferidas para câmara de crescimento e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland.

A atividade da redutase de nitrato, assim como o teor de nitrato nas folhas e raízes, foram determinados após, 0, 2, 4, 6 e 8 horas de exposição das plantas à luz. O tempo zero correspondeu a 12 horas de escuro, e cada determinação foi efetuada com 5 repetições.

De modo análogo ao descrito anteriormente, em outro lote de plantas procedentes da mesma sementeira, foi determinado o efeito do período de obscuridade na atividade enzimática, e no teor de nitrato nas folhas e raízes das plan-

tas. Deste modo, as análises foram efetuadas após 0, 2, 4, 6 e 8 horas de escuro, sendo que o tempo zero de escuro correspondeu ao final do período de 12 horas de luz.

2.6 Absorção, translocação e redução de nitrato em plantas deficientes em nitrogênio

Sementes de café foram germinadas em areia, em caixas de polietileno, em casa de vegetação. A partir do estágio de "Orelha de Onça", as plantas em desenvolvimento foram irrigadas alternadamente com água e com solução nutritiva de Hoagland completa. As plantas com 4 meses de idade passaram a receber uma solução nutritiva sem nitrogênio, com composição descrita por SARRUGE (1975), com modificações, consistindo do seguinte: 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 5 mM KCl , 5 mM CaCl_2 , 46,2 μM H_3BO_3 , 9,2 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,8 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, e 89,6 μM de Fe, sob a forma de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ mais EDTA. Após 2 e 3 meses de irrigação sem nitrogênio, respectivamente, para os estudos de indução nas folhas e nas raízes, foram determinados a atividade da redutase de nitrato e o teor de nitrato dos tecidos. No dia anterior ao das análises, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas. As determinações foram iniciadas após a exposição a 2 horas de luz, no momento em que as plantas receberam irrigação abundante com uma solução 5 mM KNO_3 e 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. A indução da enzima pelo nitrato foi avaliada após 0, 2, 4, 6 e 8 horas do fornecimento de nitrato, para os estudos nas raízes, e após 0, 2, 5 e 8 para as folhas.

2.7 Efeito do bloqueio da translocação de fotossintetizados para as raízes na atividade da redutase de nitrato das folhas e raízes

O bloqueio do transporte de fotossintetizados foi obtido por anelamento do caule das plantas, removendo-se o floema através de um anel de aproximadamente 3 mm de largura, logo abaixo da inserção das folhas cotiledonares ("Orelha de Onça"). Essa operação foi efetuada em plantas de 6 meses de idade, com aproximadamente 4 pares de folhas, cultivadas em areia, em recipiente de cimento, em casa de vegetação. Logo após o anelamento as plantas foram irrigadas com solução nutritiva de Hoagland.

A atividade da enzima redutase de nitrato das folhas e raízes, bem como o teor de nitrato das folhas, foram determinados 6, 15, 24, 48, 72 e 96 horas após o anelamento das plantas, que foram trazidas diretamente da casa de vegetação para o laboratório de análise. Para cada tempo de anelamento foram utilizadas 30 plantas intactas e 30 plantas aneladas, que foram reunidas em 5 repetições para cada tratamento. Em virtude das variações das condições climáticas (hora do dia, luz, temperatura) no momento da retirada do material para análise, os resultados da atividade enzimática e do teor de nitrato dos tecidos foram expressos pela relação entre os dados obtidos nas plantas aneladas e nas plantas controle, multiplicada por 100 (% do controle).

Os teores de açúcares totais, açúcares redutores, e sacarose, foram determinados nas raízes após 6, 15, 24, 48 e 72 horas do anelamento. De modo análogo ao descrito anteriormente, os resultados obtidos são apresentados na

forma de relação planta anelada/planta controle x 100 (% do controle).

2.8 Avaliação da redução de nitrato em folhas e raízes durante o desenvolvimento inicial das plantas

As análises de crescimento e a determinação da atividade enzimática foram iniciadas a partir do estágio de "Orelha de Onça", quando as plantas estavam com 9 semanas, e prosseguiram a cada 7 dias até a idade de 24 semanas. Neste estudo, as plantas foram conduzidas em areia, em sacos de polietileno, para facilitar a retirada das raízes, sem haver perda do material. Para evitar que variações nas condições ambientais alterassem a atividade da redutase de nitrato, 24 horas antes de cada determinação as plantas foram transferidas da casa de vegetação para câmara de crescimento, e irrigadas imediatamente com solução nutritiva até percolação. As análises foram sempre efetuadas após a exposição das plantas a 3 horas de luz.

As determinações foram efetuadas separadamente para cada tipo de tecido e para cada par de folhas, à medida que os mesmos foram se desenvolvendo. Desde modo, foram analisadas as raízes, caule (avaliado apenas o crescimento), folha cotiledonar, 1º par de folhas, e assim sucessivamente.

Em virtude da desuniformidade do crescimento inicial do cafeeiro, foram selecionadas como padrão dez mudas representativas do lote em estudo, que permaneceram intactas até o final do experimento. Deste modo, para cada determinação, foram selecionadas plantas que apresentavam apro-

ximadamente as mesmas medidas de comprimento e largura das folhas presentes nas mudas padrão. Outro modo de se atenuar possíveis erros nas amostragens foi a utilização de 5 repetições, sendo que cada repetição correspondeu à média aritmética das medidas efetuadas em 5 plantas.

A análise de crescimento consistiu de determinações do peso de matéria seca das folhas, raízes e caule, e área foliar. Os pesos de matéria seca foram determinados através de secagem do material em estufa a 60°C , até peso constante. O peso de matéria seca total das folhas foi obtido pela somatória dos pesos de todos os pares de folhas, e o peso total da planta foi calculado somando-se os pesos de matéria seca das folhas, caule e raízes.

De modo análogo às outras determinações, a área foliar foi calculada separadamente para cada par de folhas, a partir do peso de amostras de 25 discos, correspondente a $7,0686\text{ cm}^2$ de área, retirados dos respectivos pares de folhas de várias plantas, e do peso de matéria seca total dos pares de folhas correspondentes.

A contribuição de cada par de folhas, na atividade da redutase de nitrato da parte aérea, foi estimada com base nos dados obtidos quando as plantas estavam com 21 semanas de idade. Nesta determinação não foram analisados os 19 e 20 pares de folhas, para os quais foram considerados, respectivamente, os dados das determinações efetuadas nas plantas com 17 e 18 semanas de idade. Tendo-se os dados referentes ao peso de matéria fresca de cada par de folhas, e suas respectivas atividades enzimáticas expressas em micromoles de de nitrito, por hora, por grama de matéria fresca, foram cal-

culadas as atividades totais de cada par de folhas. A atividade da redutase de nitrato da parte aérea foi então calculada pela somatória das atividades totais de cada tecido.

2.9 Redução de nitrato em plantas adultas - Alterações ontogênicas

2.9.1 Atividade da redutase de nitrato nas folhas durante o ciclo produtivo das plantas

Para estudar a atividade enzimática nas folhas durante a fase produtiva, sementes de café foram colocadas para germinar em areia lavada, em casa de vegetação. Quando as plantas apresentavam aproximadamente 3 pares de folhas, o que ocorreu 4 meses após a semeadura, foram colocadas em caixa de polietileno (12 plantas por caixa), com capacidade para 14 litros, contendo inicialmente água e posteriormente solução nutritiva de Hoagland. As plantas com 7 meses de idade foram transferidas para vasos individuais de 6 litros. A solução nutritiva dos potes foi trocada mensalmente, o que foi considerado suficiente para manter as plantas em bom estado nutricional. Quando atingiram a idade de 17 meses, as plantas foram transferidas para tanques de concreto, com capacidade para 100 litros de solução, revestidos internamente com tinta neutrol, e localizados a nível de sub-solo a pleno sol. A solução nutritiva dos tanques foi renovada mensalmente, utilizando o sistema de escoamento localizado na parte inferior, e a solução foi submetida a aeração contínua por borbulhamento com ar comprimido.

A atividade da enzima redutase de nitrato das folhas, e os teores de nitrato das folhas e soluções nutritivas foram determinados mensalmente, a partir da época da primeira florada, sempre 6 dias após a troca das soluções nutritivas dos tanques.

Paralelamente às determinações das atividades enzimáticas, foram efetuadas medidas da altura e número de pares de ramos plagiotrópicos, assim como uma avaliação da fase reprodutiva das plantas em estudo. Essa avaliação foi feita através de observações visuais da distribuição percentual do número de gemas florais, de botões florais e de frutos na planta toda. Os estádios reprodutivos denominados gemas florais e botões florais, correspondem ao desenvolvimento intermediário e final da inflorescência, respectivamente, e foram selecionados como critérios com base nos estudos efetuados por GOUVEIA (1984). A percentagem de frutos observada visualmente, foi subdividida em 4 tamanhos: 1 mm (chumbinho), 1 a 3 mm, 3 a 6 mm e maior que 6 mm de diâmetro

2.9.2 Atividade da redutase de nitrato em folhas de ramos submetidos a tratamentos de remoção parcial ou total das flores

As plantas utilizadas neste estudo foram semeadas em areia, em casa de vegetação, transferidas aos 5 meses de idade para caixas coletivas, colocadas em vasos individuais aos 7 meses, e transferidas para tanques de 100 litros quando as plantas estavam com 16 meses de idade, de modo semelhante ao descrito no experimento anterior.

Quando as plantas estavam em pleno florescimento (florada principal) foram efetuados os tratamentos que consistiram no seguinte:

1. Em um dos ramos plagiatrópicos de cada planta foram removidas todas as flores presentes; o ramo diretamente oposto ao primeiro permaneceu com todas as flores e consistiu na testemunha do ramo sem flores.

2. Em outro ramo foi eliminado 50% das flores, permanecendo as flores mais próximas à base do ramo; o ramo oposto, com todas as flores, foi considerado como testemunha.

Somente os ramos opostos aos ramos tratados foram considerados como testemunha para evitar que diferenças no estágio de desenvolvimento, devido à posição dos ramos ao longo da copa da planta, pudessem mascarar possíveis efeitos dos tratamentos.

A atividade da redutase de nitrato das folhas dos ramos tratados, e os teores de nitrato das mesmas folhas e das soluções nutritivas, foram determinados 15, 42, 62, 90 e 112 dias após o tratamento de remoção das flores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Padronização da metodologia para a análise da redutase de nitrato

3.1.1. Efeito do pH e concentração de nitrato no meio de reação

Os dados apresentados na figura 2 mostram que a atividade da redutase de nitrato nas raízes aumentou com a variação do pH do tampão fosfato de 6,0 para 8,0, e declinou ligeiramente em pH 9,0. Resultados semelhantes foram obtidos por MEGURO e MAGALHÃES (1982), que verificaram em folhas de cinco cultivares de café, inclusive o Catuai, que a maior atividade enzimática foi obtida em pH 8,0. Portanto, este valor de pH parece ser o mais adequado para o ensaio "in vivo" da atividade da redutase de nitrato, tanto em folhas, como em raízes de plantas de café, sendo pois selecionado para todas as determinações enzimáticas posteriores.

O efeito do pH do meio de reação, na atividade da redutase de nitrato, é variável entre as diferentes espécies e variedades de plantas (RAVEN e SMITH, 1980; PRAKASH e NAIK, 1982; MEGURO e MAGALHÃES, 1982; RUSSO, 1983; OLIVEIRA, 1985) e, como sugerido por OLIVEIRA (1985), parece estar

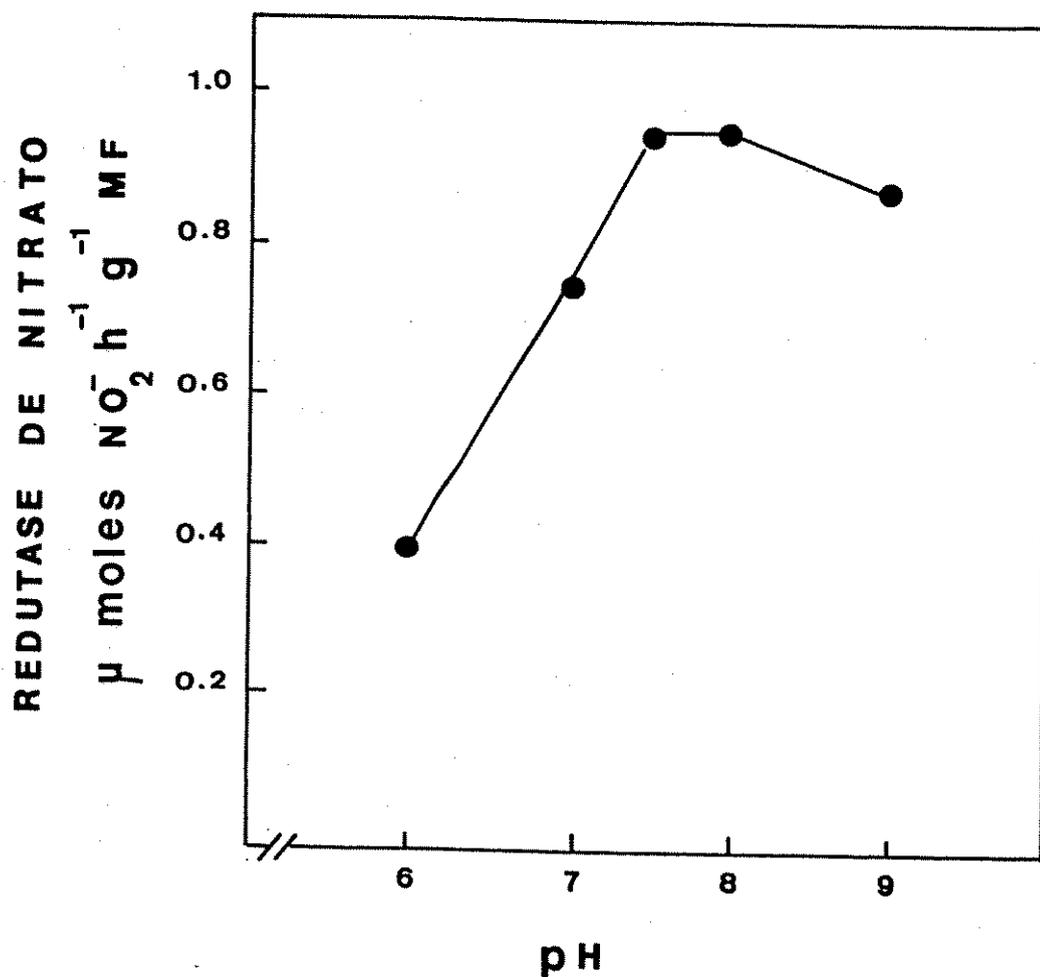


Fig. 2 - Efeito do pH do meio de reação na análise da atividade da redutase de nitrato "in vivo", em plantas de café de 5 meses de idade. Média de 4 repetições.

relacionado com a permeabilidade da membrana e também com o fluxo de nitrato e nitrito nos tecidos utilizados.

A atividade da redutase de nitrato nas raízes aumentou com o teor de nitrato do meio de ensaio até 50 mM, decrescendo progressivamente em concentrações mais elevadas (figura 3).

Em geral, as células das plantas superiores contêm dois compartimentos principais de nitrato: a) um localizado no citoplasma, onde o substrato é rapidamente metabolizável, e que pode estar envolvido na indução da redutase de nitrato; b) um compartimento de reserva, possivelmente localizado no vacúolo, inacessível à enzima (HEIMER e FILNER, 1971; FERRARI *et alii*, 1973; ASHLEY *et alii*, 1975). O aumento de 2 vezes na produção de nitrito, observado com o acréscimo da concentração de nitrato no tampão fosfato de 12,5 a 50 mM (figura 3), sugere que a atividade enzimática estava sendo limitada pela disponibilidade de substrato. As raízes em estudo apresentaram alto teor de nitrato (120 μ moles por grama de matéria fresca) que, entretanto, poderia estar compartimentalizado no vacúolo das células, não disponível no sítio de ação da enzima, limitando conseqüentemente sua atividade. Em raízes de plantas de algodão também foi verificado que a adição de 30 mM de nitrato ao meio de ensaio "in vivo", provocou aumentos de 1,7 vezes na atividade da redutase de nitrato (RADIN, 1977).

O decréscimo na atividade da redutase de nitrato nas raízes, observado em concentrações maiores que 50 mM de nitrato no tampão fosfato (figura 3), também foi documentado em folhas de plantas de café (MEGURO e MAGALHÃES, 1982).

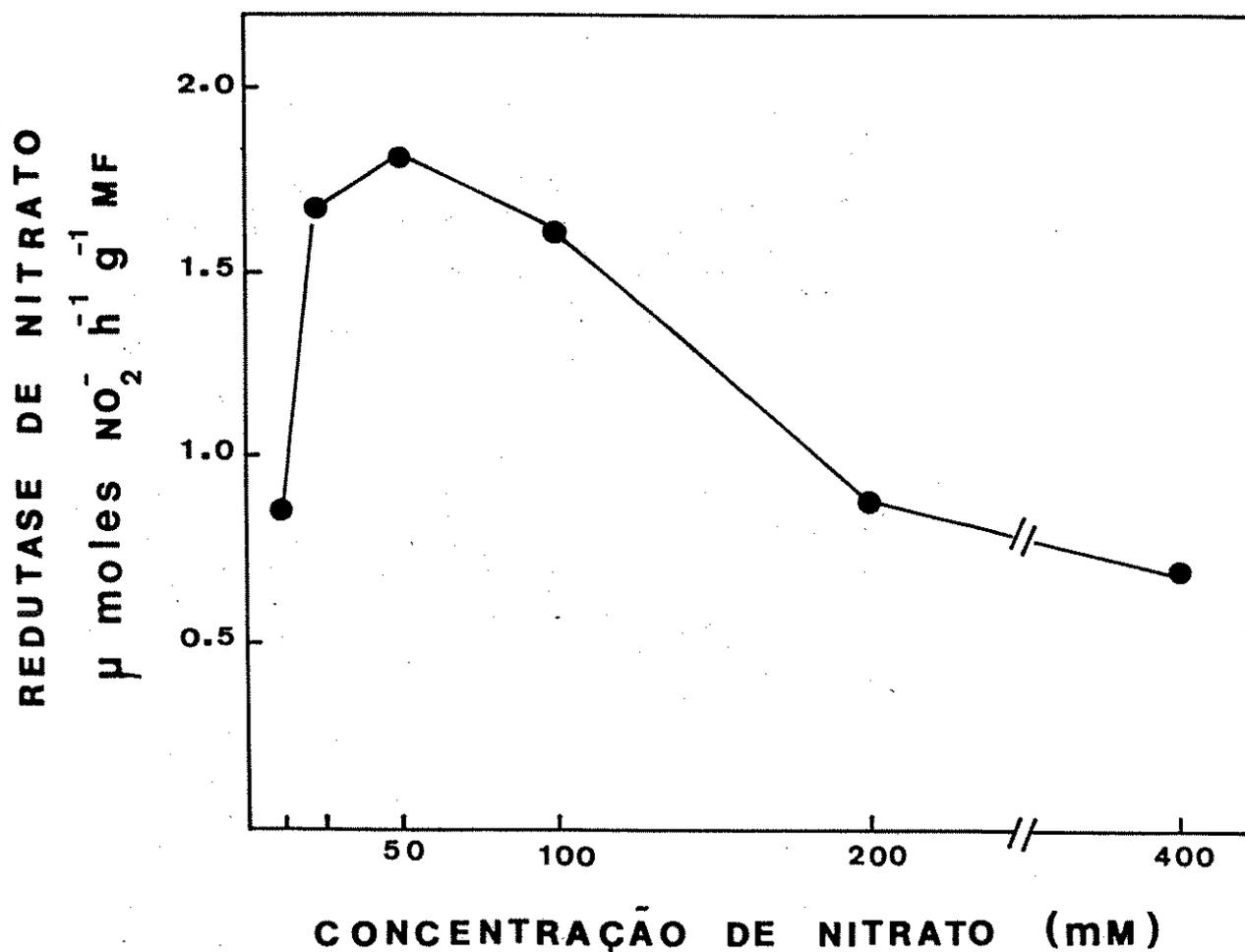


Fig. 3 - Efeito da concentração de nitrato no meio de reação na atividade da enzima redutase de nitrato, em raízes de plantas de café de 5 meses de idade. Média de 5 repetições.

Em vários tecidos vegetais, altas concentrações de nitrato inibem a atividade enzimática por mecanismos não conhecidos, considerando-se o teor de nitrato necessário para a ótima indução da atividade da enzima de cada espécie (HAGEMAN e FLESHER, 1960; BEEVERS *et alii*, 1965; CARELLI, 1979; MEGURO e MAGALHÃES, 1982; RUSSO, 1983; OLIVEIRA, 1985).

OLIVEIRA (1985) verificou que, em folhas de plantas de cana-de-açúcar, a inibição do processo de redução de nitrato parece não ser decorrente da diminuição do potencial osmótico do meio de incubação, pois não foi observada qualquer alteração significativa na atividade da enzima quando o potencial osmótico do meio contendo KNO_3 50mM foi abaixado, pela adição de manitol, até o valor correspondente ao meio com alta concentração de KNO_3 (300 mM). O autor sugeriu que a inativação da enzima poderia estar associada à alta força iônica desenvolvida no compartimento celular, onde está localizada a redutase de nitrato, causando uma desestabilização no complexo de subunidades que compõem a molécula protéica.

Em função dos resultados obtidos (figura 3), e dos apresentados na literatura (MEGURO e MAGALHÃES, 1982), ficou padronizado o meio de incubação contendo 50 mM de KNO_3 para a análise "in vivo" da redutase de nitrato em folhas e raízes de plantas de café.

3.1.2. Tempo de ensaio e efeito da anaerobiose

Os resultados do experimento visando estabelecer o tempo para a retirada das alíquotas, para a determinação da atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes,

estão expressos na figura 4. Verifica-se que existe uma relação linear entre a taxa de efluxo dos íons nitrito do tecido, resultante da reação de redução de nitrato, e o tempo de ensaio compreendido entre 15 e 60 minutos, tanto em folhas como em raízes de plantas de café. Esses resultados concordam com os obtidos por MEGURO e MAGALHÃES (1982), em diversos cultivares de café. Neste estudo foram padronizados os tempos de 15 e 45 minutos de reação para a retirada das alíquotas para a determinação da atividade da redutase de nitrato.

O borbulhamento contínuo de gás N_2 , durante a análise da redutase de nitrato "in vivo", aumentou em média 1,3 e 7,5 vezes respectivamente, as atividades enzimáticas das folhas e das raízes, em relação ao controle sem N_2 (Quadro 1). O acentuado efeito da anaerobiose na determinação da redutase de nitrato nas raízes foi confirmado nos três experimentos efetuados, nos quais foram utilizadas plantas de várias idades e cultivadas em diferentes condições ambientais. Embora o valor absoluto da atividade enzimática tenha variado de um experimento para o outro, a porcentagem de aumento na atividade, na presença de N_2 , foi praticamente a mesma (Quadro 1).

O efeito da anaerobiose no ensaio "in vivo" da atividade da redutase de nitrato em tecidos de folhas, é uma questão bastante controversa na literatura. O método "in vivo" para estimar a atividade da redutase de nitrato envolve a incubação do tecido em meio de ensaio, em condições de escuro, sendo o acúmulo de nitrito utilizado como indicador da atividade da enzima. Considerando que este método de

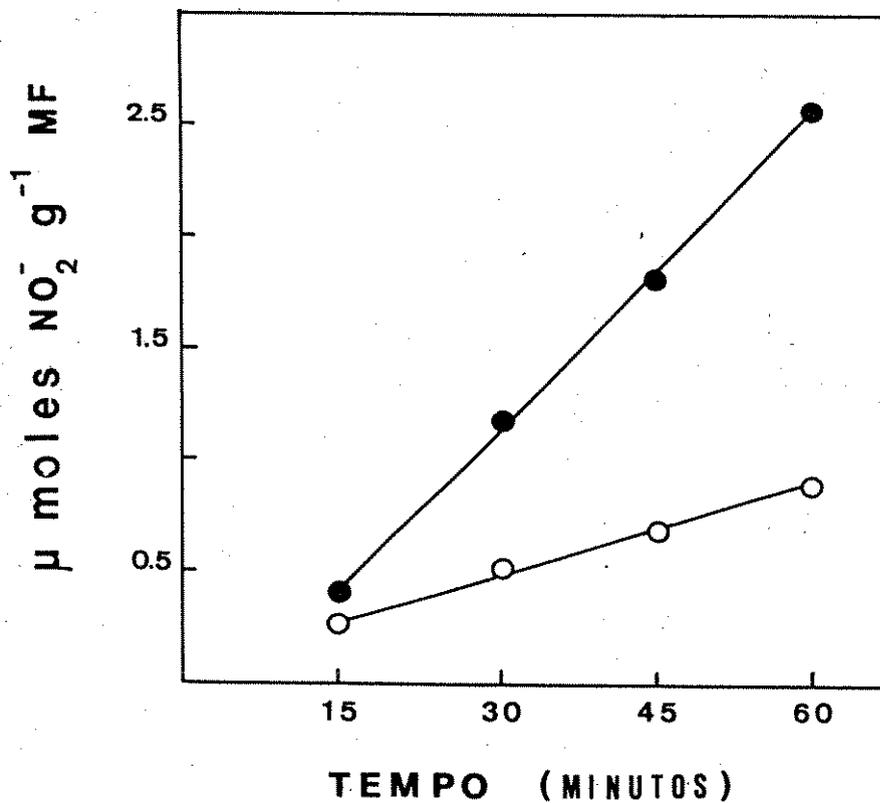


Fig. 4 - Atividade da redutase de nitrato em folhas (●—●) e raízes (○—○) de plantas de café, em função do tempo de retirada das alíquotas para a determinação da quantidade de nitrito produzido. Média de 10 repetições.

análise depende de uma avaliação precisa da quantidade de nítrito produzido, qualquer conversão de nítrito a amônia ou N-amino subestimaria a atividade da redutase de nítrato.

Quadro 1. Efeito do borbulhamento de N_2 , no meio de incubação do tecido, na atividade da redutase de nítrato "in vivo" (μ moles $NO_2^- h^{-1} g^{-1}$ MF) em folhas e raízes de café. Dados de 3 experimentos, para o caso das raízes. (Média de 10 repetições)

	Atividade da redutase de nítrato			
	μ moles $NO_2^- h^{-1} g^{-1}$ MF			
	Folhas	Raízes		
		1º Exp.	2º Exp.	3º Exp.
Com N_2	3,332	2,675	1,127	1,275
Sem N_2	2,578	0,399	0,135	0,171
d.m.s. 1%	0,418	0,304	0,150	0,181

CANVIN e ATKINS (1974) mostraram que, em folhas, o nítrito não é reduzido em condições aeróbicas no escuro. Baseando-se na hipótese de que o nítrito não é reduzido no escuro, alguns trabalhos iniciais (ATKINS e CANVIN, 1975; SAWHNEY *et alii*, 1978; CANVIN e WOO, 1979) propuseram que a diminuição da produção de nítrito, na análise da redutase de nítrato "in vivo", em condições aeróbicas, foi devido à inibição da redução de nítrato e não à ocorrência da redução de nítrito. Em contraste, vários trabalhos mostraram taxas substanciais de incorporação de $^{15}NO_3^-$ e $^{15}NO_2^-$ em amônia

e N-amino no escuro, em folhas de numerosas espécies de plantas (ASLAM *et alii*, 1979; KATO, 1980; YONEYAMA, 1981; REED *et alii*, 1983). Tais resultados têm conduzido a incertezas na interpretação do efeito da anaerobiose sobre o acúmulo de nitrito no escuro. YONEYAMA (1981) concluiu que o ensaio "in vivo" da redutase de nitrato em condições aeróbicas pode grandemente subestimar a atividade da enzima, devido à redução de nitrito, e que a anaerobiose (geralmente em atmosfera de N_2) é desejável em termos de quantidade de nitrito formado. Por outro lado, REED *et alii* (1983) verificaram que em condições anaeróbicas, a redução de ^{15}N -nitrito a amônia e N-amino, em folhas de trigo, milho, e soja, foi de 31 a 41% da taxa aeróbica no escuro. Em contraste, o acúmulo de nitrito no escuro, em folhas de algumas espécies foi 2,5 a 20 vezes maior em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas. Aquelos autores concluíram que somente a assimilação de nitrito não pode ser responsável pela inibição do acúmulo de nitrito na análise "in vivo" em condições aeróbicas, e que o O_2 aparentemente inibe a redução de nitrato no escuro. Foi proposto um modelo (REED *et alii*, 1983; ASLAM e HUFFAKER, 1984) para explicar o efeito do O_2 na redução do nitrato em tecidos de folhas. No escuro, em presença de O_2 , os mitocôndrios competem com a redutase de nitrato pelo equivalente redutor citosólico, e a redução de nitrato é inibida. Contudo, em condições anaeróbicas a competição por NADH é eliminada e, em adição os mitocôndrios geram equivalentes redutores para a redução de nitrato via "lançadeiras" oxaloacetato-malato. Isto permite supor que o nível de poder redutor citosólico, no escuro, em condições aeróbicas, pode variar em função do estágio de desenvolvimento

do tecido ou órgão, bem como com a espécie de planta (REED *et alii*, 1983).

Embora não se conheça precisamente o efeito da anaerobiose na determinação da redutase de nitrato "in vivo", as análises enzimáticas em folhas de plantas de café foram efetuadas em atmosfera de N_2 , pois como relatado anteriormente, o oxigênio promove a assimilação do nitrito no escuro.

Em tecidos não fotossintéticos o efeito da anaerobiose na atividade da redutase de nitrato é bem mais definido e, aparentemente, bloqueia a redução do nitrito produzido (FERRARI e VARNER, 1971; RADIN *et alii*, 1975). A redução da concentração de O_2 durante a determinação da redução de nitrato em raízes, seja através de vácuo ou atmosfera de N_2 , é uma técnica que vem sendo adotada rotineiramente no ensaio da redutase de nitrato nestes tecidos (ASLAM e OAKS, 1975; RADIN, 1978; CRAFTS-BRANDNER e HARPER, 1982). Em raízes de plantas de café, o borbulhamento de N_2 no meio de análise provocou aumento médio de 7,5 vezes na produção de nitrito (Quadro 1), em relação às determinações sem N_2 . FERRARI e VARNER (1971) demonstraram que a anaerobiose inibiu em mais de 90% a redução do nitrito em camadas intactas de aleurona de sementes de cevada.

Em função dos resultados obtidos no presente trabalho, todas as determinações da atividade da redutase de nitrato "in vivo", em raízes de plantas de café, foram sempre efetuadas com borbulhamento contínuo de N_2 .

3.1.3. Definição da idade do tecido da raiz

A atividade da redutase de nitrato, determinada nas regiões mais jovens das raízes, foi em média 2,4 vezes maior do que a da região mais diferenciada, independente da fase de desenvolvimento das plantas estudadas (Quadro 2). Resultados semelhantes foram obtidos por WALLACE (1973), que verificou que a atividade enzimática no ápice (0-5mm) de raízes de milho foi 2,5 vezes maior do que nas seções mais maduras, distantes 5 a 15mm e 30 a 40mm da ponta da raiz.

Em folhas, o decréscimo na atividade da redutase de nitrato, que se manifesta com a idade, tem sido correlacionado com a capacidade do tecido em sintetizar proteínas (WALLACE e PATE, 1965; KANNANGARA e WOOLHOUSE, 1967; BEEVERS e HAGEMAN, 1969; TRAVIS e KEY, 1971).

Em raízes, pode ocorrer uma situação análoga, pois a taxa de síntese de proteínas, e especificamente da proteína redutase de nitrato, é mais rápida nas regiões meristemática (apicais), do que nos tecidos mais maduros (CLOWES, 1958; PATE, 1973; ASLAM e OAKS, 1975; OAKS *et alii*, 1980). Em adição, os valores mais elevados de atividade enzimática, obtidos nas extremidades de raízes de milho, em relação as regiões mais maduras, foram sempre acompanhados por maiores teores de proteína (WALLACE e PATE, 1973; OAKS *et alii*, 1980). Portanto, o menor potencial de redução de nitrato das raízes mais maduras de plantas de café (Quadro 2) poderia, possivelmente, estar associado a uma redução da capacidade de sintetizar proteínas.

Quadro 2. Atividade da redutase de nitrato (μ moles $\text{NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) e teor de nitrato (μ moles $\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), em diversos componentes do sistema radicular de plantas de café de várias idades (Média de 5 repetições)

Idade da Planta	Componentes da raiz	RN	NO_3^-
2 meses	Piv.vertical	0,62	-
	Laterais	1,53	-
7 meses	Laterais	0,43	98
	Sup.Absorventes	0,83	107
10 meses	Laterais	0,57	99
	Sup.Absorventes	1,43	98
28 meses	Sup.Absorventes	0,51	-
	Absorventes	1,32	-

Abreviaturas: Piv. = pivotante; Sup. = Suporte

Na realização do presente trabalho, abordando a redução de nitrato em plantas de várias idades e estádios fisiológicos, foi sempre avaliado o componente mais jovem do sistema radicular, procurando dessa forma minimizar os erros de amostragens.

3.2. Efeito da luz na atividade da redutase de nitrato

A atividade da redutase de nitrato e o teor de nitrato em folhas e raízes de plantas de café de 6 meses de idade, foram determinados em períodos de 8 horas de luz

ou 8 horas de escuro, em fotoperíodo de 12 horas.

Os resultados apresentados na figura 5A mostram que a atividade da redutase de nitrato nas folhas permaneceu constante nas primeiras 2 horas de luz, e decresceu posteriormente durante todo o período luminoso. Esse declínio se estendeu até as 2 primeiras horas de escuro, quando então começou a aumentar, atingindo um pico após 4 horas de escuro.

O teor de nitrato nas folhas permaneceu aproximadamente constante durante o período de iluminação, mostrou tendência a aumentar entre 2 e 6 horas de escuro e a de crescer posteriormente (Figura 5B).

A luz é um importante fator na indução e manutenção da atividade da redutase de nitrato em tecidos vegetais, e parece envolver a participação do fitocromo (HEWITT, 1975; SRIVASTAVA, 1980; GUERRERO *et alii*, 1981).

As inter-relações entre a luz e a assimilação de nitrato são múltiplas e complexas e de difícil interpretação (BEEVERS e HAGEMAN, 1969; HEWITT *et alii*, 1976; SRIVASTAVA, 1980). Várias hipóteses têm sido propostas para explicar os mecanismos de indução-ativação da redutase de nitrato pela luz (SRIVASTAVA, 1980): 1. a luz pode estimular a atividade da redutase de nitrato através do aumento na absorção de nitrato; 2. a fotossíntese está envolvida na indução da redutase de nitrato direta, ou indiretamente através do aumento na síntese citoplasmática de proteínas; 3. a luz pode aumentar a atividade da redutase de nitrato por induzir a síntese de mRNA e conseqüentemente a síntese de proteínas; 4. os níveis de redutase de nitrato na luz e escuro são regulados por

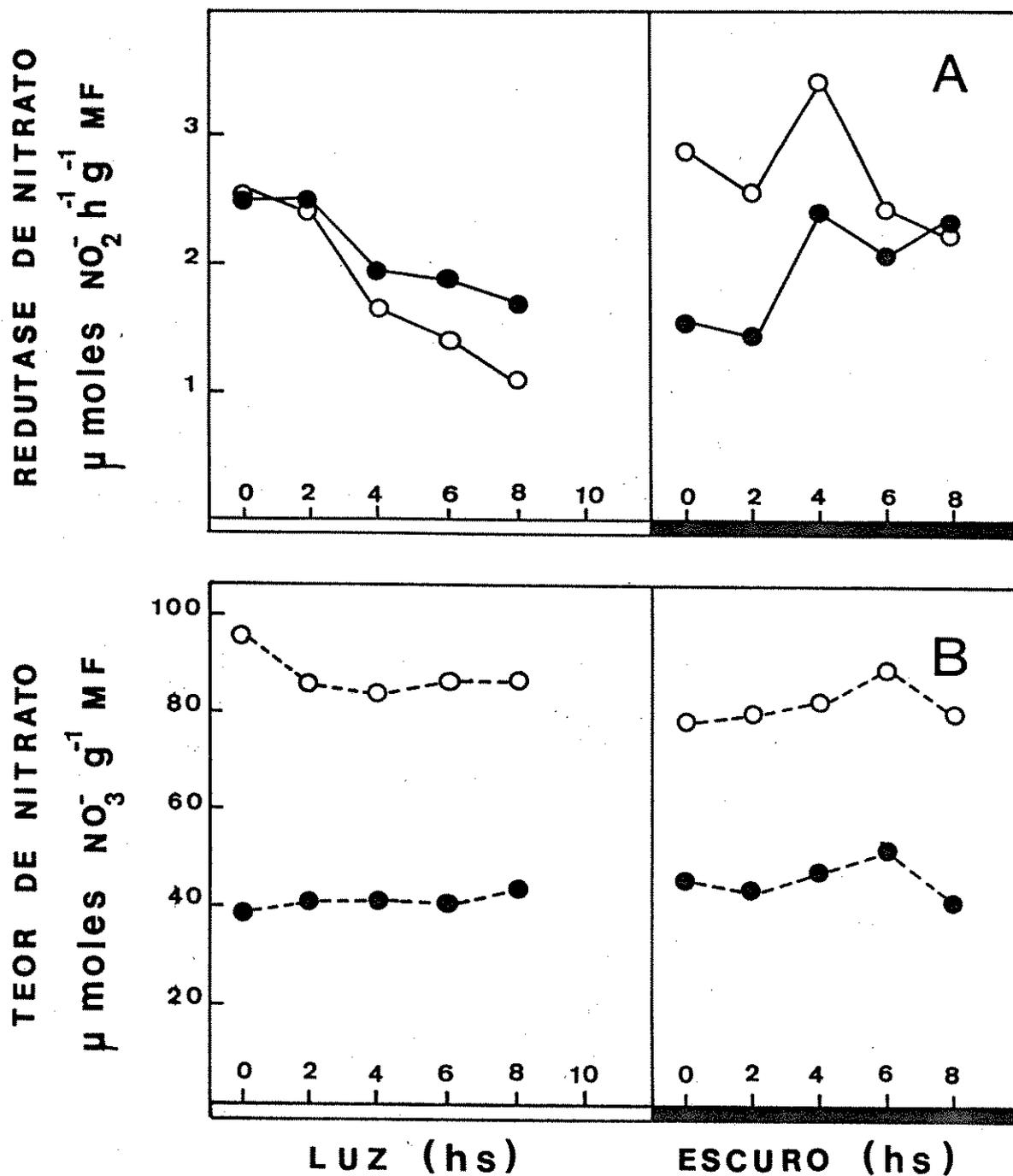


Fig. 5 - Efeito da luz e escuro na atividade da redutase de nitrato e no teor de nitrato, em folhas e raízes de plantas de café de 6 meses de idade. A- redutase de nitrato nas folhas (●—●) e nas raízes (○—○). B- teor de nitrato nas folhas (●---●) e nas raízes (○---○). Dados médios de 5 repetições.

ativadores ou inibidores específicos da enzima.

Vários autores têm demonstrado que a atividade da redutase de nitrato nas folhas de numerosas espécies, apresenta flutuações diárias, com um pico máximo ao redor do meio dia, mas de um modo geral aumenta durante as horas de luz e decresce no escuro (HARPER e HAGEMAN, 1972; NICHOLAS *et alii*, 1976; LEWIS *et alii*, 1982; LILLO, 1983, 1984; HIPKIN *et alii*, 1984).

Em folhas de plantas de café ocorre exatamente o contrário. A atividade da redutase de nitrato decresce durante as horas de luz e aumenta no período escuro (figura 5A). Esses resultados estão de acordo com CORDEIRO *et alii* (1984), que verificaram que a atividade da redutase de nitrato, em plantas de café de 6 meses de idade, variou durante os períodos alternados de luz e escuro (fotoperíodo de 12 horas), declinou gradualmente ao longo do período luminoso e aumentou no período escuro, quando apresentou dois picos. Essas flutuações repetiram-se a cada 24 horas indicando um ritmo circadiano desta enzima no cafeeiro (CORDEIRO *et alii*, 1984).

Antes de qualquer discussão a respeito do efeito da luz na atividade da redutase de nitrato em plantas de café, algumas considerações devem ser feitas. O *Coffea arabica* é originário da Etiópia onde cresce permanentemente sob densas florestas tropicais. No Brasil, o cafeeiro é cultivado a pleno sol, mas em alguns países como a Colômbia existem cafezais sombreados. Tradicionalmente a produção de mudas de café é feita sob telados ou ripados, ou seja, em condições sombreadas. FALEIROS *et alii* (1975) estudaram a

nutrição nitrogenada e o desenvolvimento de mudas de café em condições sombreadas e a pleno sol, e constataram que as plantas cultivadas a meia sombra apresentaram maior vigor, com maior área foliar, maior altura, maior número de folhas e maior atividade da redutase de nitrato, do que as plantas cultivadas a pleno sol. Por outro lado, KUMAR e TIESZEN (1980) verificaram que a taxa fotossintética de plantas de café, crescidas sob condições de sombreamento, foi substancialmente maior do que nas cultivadas a pleno sol, embora nessas últimas o nível de radiação saturante tenha sido maior.

Plantas de café e de cacau são as únicas citadas até o presente momento nas quais a atividade da redutase de nitrato nas folhas é maior no escuro do que na luz (CORDEIRO *et alii*, 1984). Deve ser ressaltado que tanto a produção de mudas, como a cultura do cacau no campo se desenvolve sob condições de aproximadamente 70% de sombreamento. Portanto, parecem existir diferenças nos mecanismos que controlam o processo de assimilação de nitrato entre as espécies adaptadas à sombra, e as espécies que se desenvolvem a pleno sol.

Uma das linhas de evidência sugere que o papel da luz na indução da atividade da redutase de nitrato está relacionado com a fotossíntese (SRIVASTAVA, 1980). SMIRNOFF (1985) sugeriu que quando a intensidade luminosa não é suficiente para saturar a fotossíntese, o nitrato e o dióxido de carbono competiriam pela energia fotoquímica. Deste modo, no presente trabalho, o decréscimo na atividade enzimática que ocorreu na luz poderia ser atribuído a relativamente baixa intensidade luminosa utilizada, ou seja, $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Entretanto, já foi demonstrado anteriormente (CARELLI *et alii*, 1985) que a atividade da redutase de nitrato decresceu durante o período luminoso mesmo em intensidade luminosa de $400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nível este acima da saturação lumínica para plantas de café crescidas em condições sombreadas (KUMAR e TIESZEN, 1980; FAHL e CARELLI, 1984), como é o caso das plantas utilizadas neste trabalho.

ASLAM *et alii* (1979) verificaram, em plantas de cevada, que a assimilação de nitrato, ocorre tanto na luz como no escuro, embora a taxa de redução na luz seja o dobro daquela do escuro. A maior redução de nitrato na luz foi atribuída ao fornecimento de energia redutora pelos produtos da recente fixação de CO_2 , possivelmente através de reações de "lançadeiras" entre o cloroplasto e o citoplasma. No escuro, a energia para a redução do nitrato aparentemente derivaria dos produtos armazenados (ASLAM *et alii*, 1979). Esses resultados foram posteriormente confirmados por ASLAM e HUFFAKER (1984), que propuseram que a redução de nitrato no escuro em folhas é controlada pelo nível de carboidratos no tecido. Em folhas de *Capsicum annum*, STEER (1974) verificou que a atividade da redutase de nitrato exibiu três picos distintos: um no período escuro, um segundo no início da manhã, e um terceiro 6 horas após o início do fotoperíodo. Foi sugerido que os dois picos de atividade da redutase de nitrato, que ocorreram no período luminoso, dependeriam da disponibilidade de poder redutor gerado nos cloroplastos, enquanto que o pico ocorrido no período escuro seria dependente do fornecimento de NADH da atividade respiratória, de modo similar à atividade da redutase de nitrato em tecidos não verdes.

Aparentemente o decréscimo na atividade da redutase de nitrato, que é observado durante o período luminoso, não foi devido a limitações na fotossíntese. CARELLI *et alii* (1985) verificaram que a taxa de fotossíntese líquida em plantas de café aumentou até a segunda hora de luz, permaneceu aproximadamente constante entre 3 e 6 horas de luz, e decresceu posteriormente, enquanto que a atividade da redutase de nitrato diminuiu progressivamente durante todo o período luminoso.

As considerações feitas acima poderiam indicar que a redutase de nitrato em folhas de café utilizaria preferencialmente a energia gerada a partir da oxidação dos carboidratos, a exemplo do que ocorre nas raízes. A semelhança existente entre as curvas de atividade da redutase de nitrato, nas folhas e raízes durante o período luminoso (figura 5A), reforçam essa hipótese. Deste modo, na luz ocorreria menor oxidação de carboidratos em virtude da alta relação ATP/ADP (GRAHAM e CHAPMAN, 1979) e, conseqüentemente, menor atividade da redutase de nitrato. No escuro, os fotosintetizados produzidos no período luminoso seriam oxidados no processo respiratório, e haveria maior energia disponível para a redução de nitrato. CORDEIRO *et alii* (1984) mostraram que os níveis de atividade da redutase de nitrato em folhas de plantas de café, mantidas em luz contínua, foram bem mais baixos (atingindo valores próximos a zero após 12 horas de luz) do que os obtidos em plantas cultivadas em períodos alternados de luz e escuro.

De modo semelhante ao observado para as folhas, a redução de nitrato nas raízes decresceu continuamente durante o período de luz (figura 5A). Na obscuridade

os níveis de atividade da redutase de nitrato nas raízes foram bem mais elevados do que no período luminoso, ocorrendo um pico após 4 horas de escuro e decrescendo posteriormente.

O padrão de variação da atividade da redutase de nitrato durante os períodos de luz e escuro foi semelhante para tecidos de folhas e raízes (figura 5A). Entretanto, a redução de nitrato no escuro foi maior nas raízes do que nas folhas, havendo uma inversão do processo na luz. ASLAM *et alii* (1979) verificaram que a baixa redução de nitrato que ocorreu em plântulas de cevada deficientes em carboidratos, em condições de escuro ou de luz-menos CO₂, aparentemente teve lugar nas raízes. Esses resultados foram posteriormente confirmados por ASLAM e HUFFAKER (1982), que verificaram que, no escuro, aproximadamente 40% da redução de nitrato ocorreu nas raízes de plantas de cevada, enquanto que, na luz, somente 20% da redução de nitrato teve lugar nesse órgão. Portanto, como observado em plantas de café, parece que a proporção de redução de nitrato nas raízes, em relação a redução total da planta, é maior no escuro do que na luz.

O efeito de períodos alternados de luz e escuro, na atividade da redutase de nitrato nas raízes, pode variar entre as diferentes espécies de plantas e com as condições experimentais. Em plantas de algodão (RADIN, 1977) e de cevada (LEWIS *et alii*, 1982), a atividade da redutase de nitrato nas raízes não variou durante o período experimental de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Por outro lado, em raízes de plantas de trigo UPCROFT e DONE (1976), observaram que a atividade da redutase de nitrato apresentou um ritmo circadiano, e foi muito mais elevada em plântulas crescidas sob luz contínua. Do mesmo modo, a luz estimulou a atividade

da redutase de nitrato em raízes de macieira, sendo que a atividade em plantas cultivadas durante 48 horas no escuro, antes da análise, foi bem menor do que aquela obtida em plantas crescidas em períodos alternados de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (FRITH, 1974).

As flutuações observadas na atividade da enzima redutase de nitrato em raízes, durante os períodos de luz e escuro, têm sido atribuídas a variações na disponibilidade de carboidratos e cofatores reduzidos, e a fatores internos que regulam o fluxo de assimilados provenientes da parte aérea (WALLACE e PATE, 1965, 1967; FRITH, 1974; ASLAM e HUFFAKER, 1982).

Como será posteriormente apresentado neste trabalho, a atividade da redutase de nitrato nas raízes é bastante dependente da contínua translocação de assimilados da parte aérea para as raízes. Os resultados mostraram que após 6 horas de remoção do floema, na parte basal do caule, a atividade da redutase de nitrato e o teor de açúcares totais nas raízes das plantas aneladas foram reduzidos em 35 e 31%, respectivamente, em relação as plantas intactas. Como foi mostrado anteriormente, a atividade da redutase de nitrato em raízes de plantas de café foi mais elevada durante o período escuro. Portanto, pode-se sugerir que durante as primeiras 6 horas de escuro ocorreu maior translocação de fotossintetizados para as raízes, o que resultaria em acréscimos nos níveis de atividade da redutase de nitrato neste tecido durante este período. Este fato poderia também justificar a maior atividade da redutase de nitrato nas raízes em relação as folhas, observada no período escuro. Essas

sugestões são de certo modo concordantes com os resultados obtidos por ASLAM e HUFFAKER (1982) que verificaram, em plantas intactas de cevada, que durante o período escuro as folhas perderam 75% do teor de carboidratos solúveis, enquanto que as raízes perderam apenas 15%, possivelmente em virtude da contínua translocação de fotossintetizados para outras partes da planta.

3.3. Absorção, translocação e redução do nitrato

As curvas de acúmulo de nitrato e da atividade da redutase de nitrato, após o fornecimento de nitrato às plantas de café deficientes em nitrogênio, são apresentadas na figura 6.

Nas primeiras duas horas de exposição das raízes ao nitrato a taxa de acúmulo apresentou valores baixos ($0,55 \mu \text{ moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), evoluindo após esse tempo para uma fase mais acelerada e constante de $0,85 \mu \text{ moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ (figura 6A). Nas folhas, a taxa de acúmulo também foi inicialmente mais baixa ($0,78 \mu \text{ moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), atingindo um valor máximo entre duas e quatro horas após a exposição das plantas ao nitrato ($1,17 \mu \text{ moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), decrescendo suavemente a seguir (figura 6B).

Os teores de nitrato das folhas e raízes, após oito horas de fornecimento de nitrato, aumentaram, respectivamente, de 4,51 para 11,57 e de 5,22 para 11,39 $\mu \text{ moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, indicando que houve uma eficiente translocação do nitrato absorvido para a parte aérea. Esses resultados mostram também que houve uma distribuição do nitrato absorvido entre a raiz e a parte aérea.

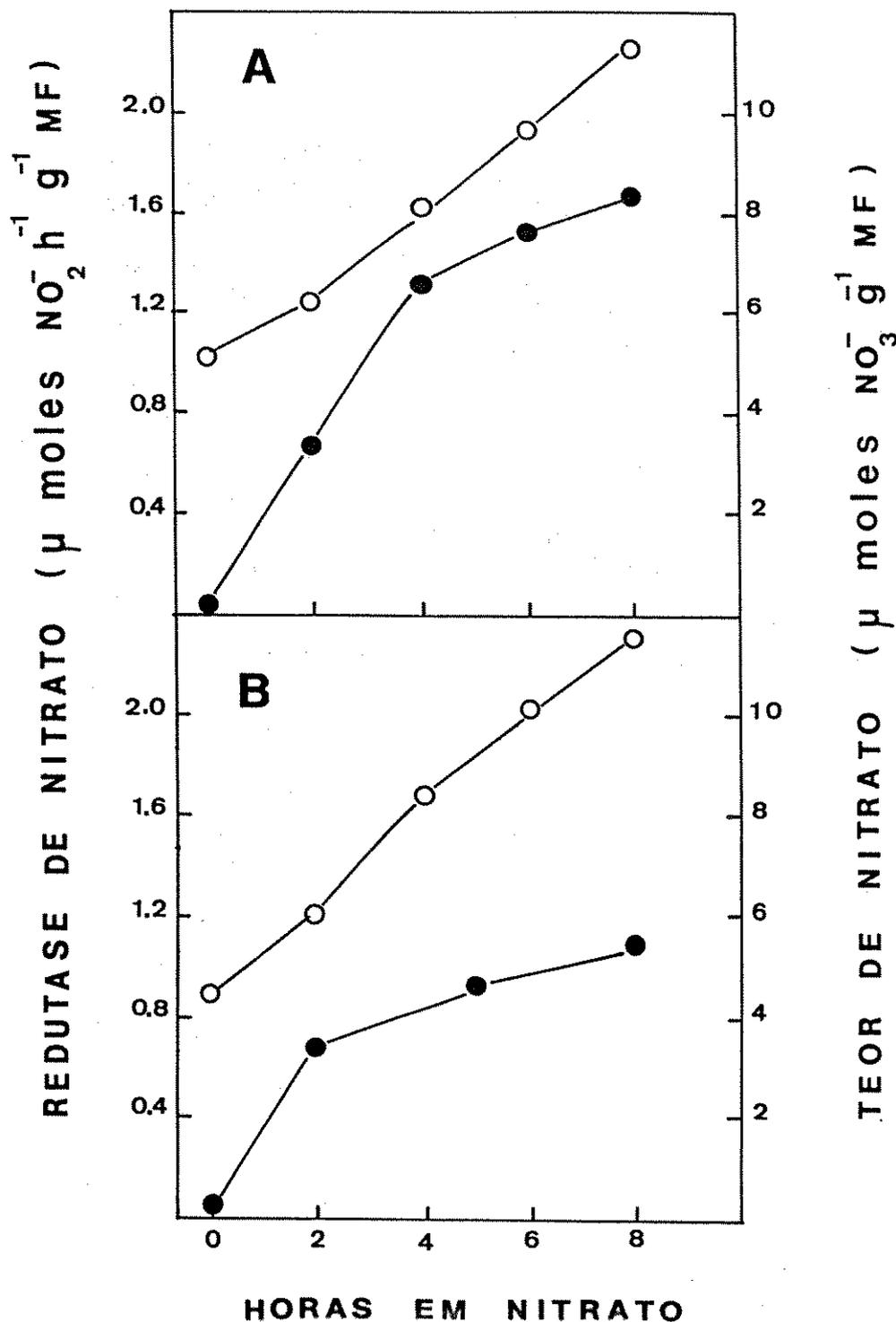


Fig. 6 - Indução da atividade da redutase de nitrato e acúmulo de nitrato em raízes (A) e folhas (B) de plantas de café deficientes em nitrogênio, após o fornecimento de 15 mM de nitrato. Redutase de nitrato (●—●), teor de nitrato (O—O).

A atividade da redutase de nitrato (determinada com a adição de nitrato no meio de incubação das amostras) aumentou linearmente nas primeiras quatro horas de fornecimento de nitrato às plantas; após esse tempo, a atividade enzimática continuou a aumentar embora menos intensamente (figura 6A). Nas folhas a atividade enzimática apresentou um aumento mais acentuado nas primeiras duas horas e, de modo semelhante às raízes, continuou a aumentar tendendo a atingir a estabilidade. Em folhas destacadas de plântulas de maçã (KLEPPER e HAGEMAN, 1969) e de *Prunus* (LEECE *et alii*, 1972) cultivadas em meio desprovido de nitrato, a atividade da redutase de nitrato aumentou até aproximadamente cinco horas após o fornecimento de nitrato, decrescendo a seguir.

A atividade enzimática nas plantas de café, antes do fornecimento de nitrato, foi praticamente nula nas raízes e nas folhas, e atingiu os valores de 1,11 e 1,69 μ moles de NO_2^- por hora, por grama de matéria fresca, respectivamente para as folhas e raízes, após oito horas de tratamento com nitrato. Portanto, os resultados mostram que durante as primeiras horas de utilização de nitrato, a atividade da redutase de nitrato foi maior nas raízes, quando comparada com as folhas. Resultados semelhantes foram obtidos por BRETELER *et alii* (1979) em plantas de feijão.

A eficiência de absorção de nitrato das raízes desempenha um importante papel no controle da quantidade do íon fornecido para as plantas, quando a disponibilidade no solo não é um fator limitante.

A absorção de nitrato, em função do tempo, em plântulas de milho (JACKSON *et alii*, 1973; NEYRA e HAGEMAN, 1975), de cevada (CHANTAROTWONG *et alii*, 1976; RAO e RAINS,

1976), de trigo (ASHLEY *et alii*, 1975), de algodão e de fumo (JACKSON *et alii*, 1972), é sempre caracterizada por uma baixa taxa inicial que aumenta gradualmente até atingir uma taxa constante. Esse típico padrão bifásico mostra a natureza indutiva do processo de absorção de nitrato (ASHLEY *et alii*, 1975; NEYRA e HAGEMAN, 1975; CHANTAROTWONG *et alii*, 1976). A fase acelerada de absorção de nitrato é marcadamente inibida por baixas temperaturas, anaerobiose e inibidores de síntese de proteínas, sugerindo que este processo requer energia metabólica e síntese de uma proteína específica carregadora de nitrato (JACKSON *et alii*, 1973; NEYRA e HAGEMAN, 1975).

O acúmulo de nitrato nas raízes pode ser considerado como indicativo da absorção de nitrato, pois esses dois processos apresentam padrões cinéticos muito semelhantes (CHANTAROTWONG *et alii*, 1976). Deste modo, como ocorre em espécies herbáceas, a absorção de nitrato em plantas de café é também caracterizada por duas fases, uma taxa inicial mais baixa, seguida por uma fase acelerada, indicando a natureza indutiva deste processo.

A redutase de nitrato é uma enzima induzível pelo substrato (HAGEMAN e FLESHER, 1960; BEEVERS *et alii*, 1965; BEEVERS e HAGEMAN, 1969), e acredita-se que a taxa de influxo de nitrato para o sítio de indução seja o principal fator no controle do nível da enzima nos tecidos (JACKSON *et alii*, 1973; NEYRA e HAGEMAN, 1975; BRETELER *et alii*, 1979).

De um modo geral, nas raízes de plantas anuais o padrão de indução da atividade da redutase de nitrato em função do tempo é coincidente com o padrão de absorção de nitrato (JACKSON *et alii*, 1973; NEYRA e HAGEMAN, 1975;

BRETELER *et alii*, 1979). A indução da atividade da redutase de nitrato (com a adição de nitrato) em raízes de plantas de café não foi paralela ao aumento no teor de nitrato dos tecidos. Após quatro horas de fornecimento de nitrato a atividade enzimática mostrou tendência a estabilizar, enquanto que o acúmulo de nitrato nas raízes continuou a aumentar linearmente. Esses dados sugerem que, aparentemente, houve uma saturação do sistema enzimático e outros fatores tais como a disponibilidade de energia passaram a limitar o aumento na taxa de redução de nitrato.

As raízes e folhas de plantas de café deficientes em nitrogênio mostraram padrões semelhantes de acúmulo de nitrato durante as primeiras oito horas de suprimento de nitrato, demonstrando uma eficiente translocação do íon para a parte aérea. Por outro lado, a redutase de nitrato foi rapidamente induzida, tanto nas raízes como nas folhas, logo após as primeiras horas de fornecimento de nitrato às plantas. Esses resultados reforçam a sugestão apresentada por RADIN (1978), na qual a capacidade das raízes em transportar nitrato para a parte aérea desempenha um importante papel na distribuição da atividade da redutase de nitrato entre esses dois órgãos.

3.4. Efeito do bloqueio da translocação de fotossintetizados para as raízes na atividade da redutase de nitrato das folhas e raízes

Conforme mostram os resultados apresentados na figura 7A, a atividade da redutase de nitrato nas folhas das plantas aneladas aumentou com o tempo de anelamento até

15 horas, declinou posteriormente até 48 horas, e manteve-se constante até o final do experimento. Essa queda na atividade enzimática pode ter sido causada pelo decréscimo na disponibilidade de nitrato, através da inibição da absorção pelas raízes. A figura 7B mostra que a concentração de nitrato nas folhas decresceu somente após 48 horas de anelamento, em relação ao controle, acompanhando aproximadamente a curva de atividade enzimática. Entretanto, como a capacidade das raízes em fornecer nitrato para a parte aérea parece desempenhar um papel muito mais importante na indução da enzima nas folhas, do que o teor de nitrato do tecido, que pode estar compartimentalizado e portanto não acessível ao sítio de ação da enzima (HEIMER e FILNER, 1971; FERRARI *et alii*, 1973; ASHLEY *et alii*, 1975; SHANER e BOYER, 1976), outro experimento foi realizado de modo a confirmar ou explicar os resultados obtidos. Neste estudo, destinado à verificação da absorção e translocação de nitrato para as folhas, foram utilizadas plantas com 4 meses de idade, com 4 a 5 pares de folhas, cultivadas em areia e irrigadas alternadamente com água e com solução de Hoagland completa. As plantas passaram então a receber solução nutritiva sem nitrogênio, a fim de esgotar o nitrato contido nos tecidos. Após 2 meses, quando as plantas já se apresentavam cloróticas, indicando a deficiência de nitrogênio, foi efetuado o bloqueio do floema em um grupo de plantas, permanecendo outro lote como testemunha. Após 48 horas de anelamento as plantas foram então irrigadas com solução 15 mM de nitrato. Como pode ser observado na figura 8, as curvas do teor de nitrato nas folhas das plantas intactas e aneladas foram semelhantes até a sexta hora de

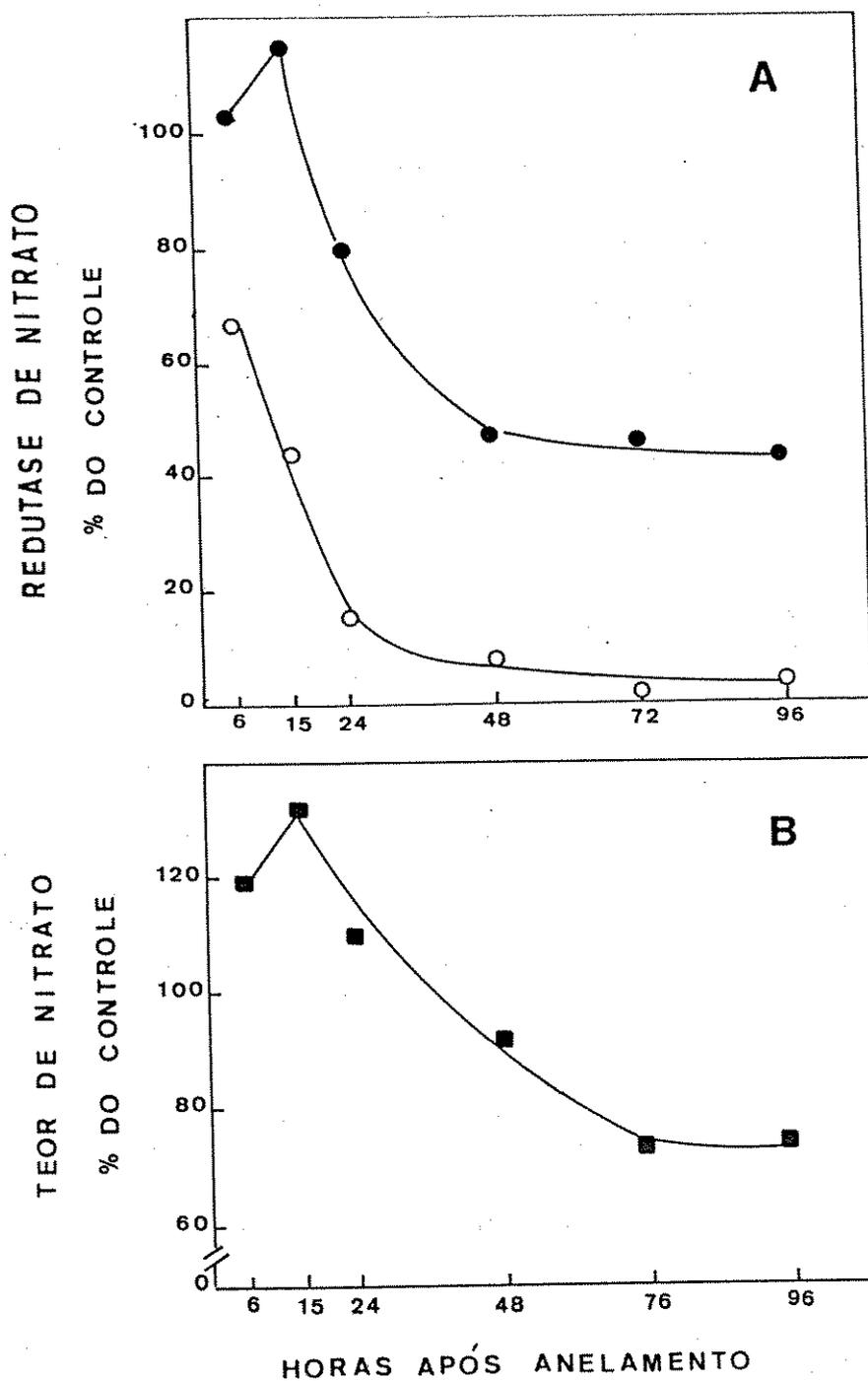


Fig. 7 - Alterações na atividade da redutase de nitrato nas folhas e raízes, e no teor de nitrato das folhas, após o anelamento de plantas de café de 6 meses de idade. Os valores são expressos em porcentagem em relação às plantas intactas. Dados médios de 5 repetições. A- atividade da redutase de nitrato nas folhas (●—●) e raízes (O—O); B- teor de nitrato nas folhas (■—■).

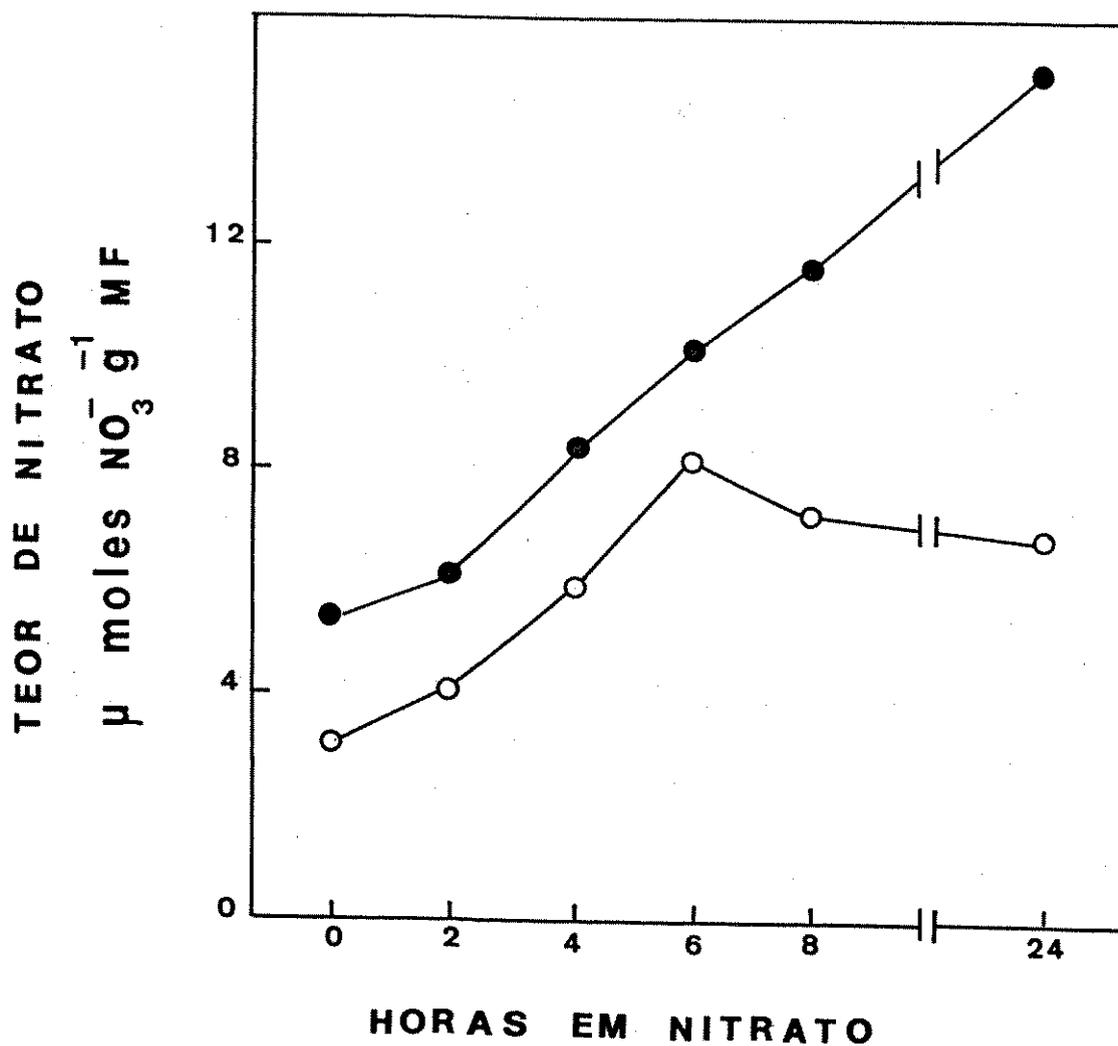


Fig. 8 - Acúmulo de nitrato em folhas de plantas de café deficientes em nitrogênio, intactas e com 48 horas de anelamento, após a irrigação com solução 15 mM de nitrato. Dados médios de 5 repetições. Plantas testemunhas (●—●), plantas aneladas (○—○).

fornecimento de nitrato. Esse fato indica que a taxa de absorção de nitrato pelas raízes, e consequente translocação para a parte aérea, foi semelhante nas primeiras 6 horas, em plantas intactas e em plantas com 48 horas de anelamento. Após esse tempo, o teor de nitrato nas folhas das plantas aneladas decresceu suavemente, enquanto que as folhas das plantas testemunhas continuaram a acumular nitrato. Esses resultados sugerem que somente após 54 horas de anelamento é que ocorreu uma limitação do fornecimento de nitrato para a atividade da redutase de nitrato nas folhas das plantas aneladas.

A atividade da redutase de nitrato nas raízes declinou rapidamente com o anelamento das plantas (figura 7A). Após 6 horas de bloqueio do floema a atividade enzimática nas raízes das plantas aneladas foi 66% do controle, e atingiu níveis bem baixos (7%) após 48 horas.

A assimilação de nitrato requer energia metabólica e esqueletos de carbono os quais, em órgãos heterotróficos como as raízes, são fornecidos pelos fotossintetizados produzidos na parte aérea e transportados até o sistema radicular. Em plantas de café ficou evidente a importância de um contínuo suprimento de assimilados da parte aérea para manter o processo de redução de nitrato nas raízes, concordando com os resultados obtidos por outros autores, em diversas espécies de plantas (RADIN *et alii*, 1978; DEANE-DRUMOND e CLARCKSON, 1979; BRETELER e HANISH TEN CATE, 1980; ASLAM e HUFFAKER, 1982; OAKS e HIREL, 1985).

O teor de sacarose das raízes das plantas aneladas decresceu rapidamente, atingindo valores próximos a

zero após 24 horas de bloqueio do floema (figura 9). Por outro lado, os decréscimos nos teores de açúcares totais e de açúcares redutores (glicose, frutose) foram bem menos acentuados do que o da sacarose. Esses resultados são coerentes com o fato de que, na maioria das espécies, a sacarose é a principal forma de carboidrato transportada pelo floema (ZIEGLER, 1975; PATE, 1980).

Os resultados deste trabalho concordam com os obtidos em plantas de algodão que sofreram anelamento ou remoção da parte aérea, nas quais a atividade da redutase de nitrato nas raízes declinou rapidamente, os teores de glicose e frutose apresentaram pequenas alterações, enquanto que a sacarose decresceu drasticamente (RADIN *et alii*, 1978).

Excetuando-se a sacarose, os açúcares redutores (glicose, frutose) e os açúcares totais decresceram bem menos intensamente que a atividade da redutase de nitrato nas raízes das plantas aneladas. Esses resultados sugerem que o processo de redução de nitrato em raízes de plantas de café é bastante dependente dos carboidratos fornecidos pela parte aérea e que as reservas presentes não são suficientes para manter a atividade da redutase de nitrato.

SAHULKA e LISÁ (1980) verificaram em raízes destacadas de ervilha que, somente alguns dentre os vários açúcares testados foram capazes de manter altas taxas de respiração, enquanto que a indução da redutase de nitrato ocorreu com o fornecimento de todos os açúcares estudados. Os autores sugeriram que os açúcares apresentam um efeito positivo, embora não específico, na indução da atividade da redutase de nitrato. HANISCH TEN CATE e BRETELER (1981), também

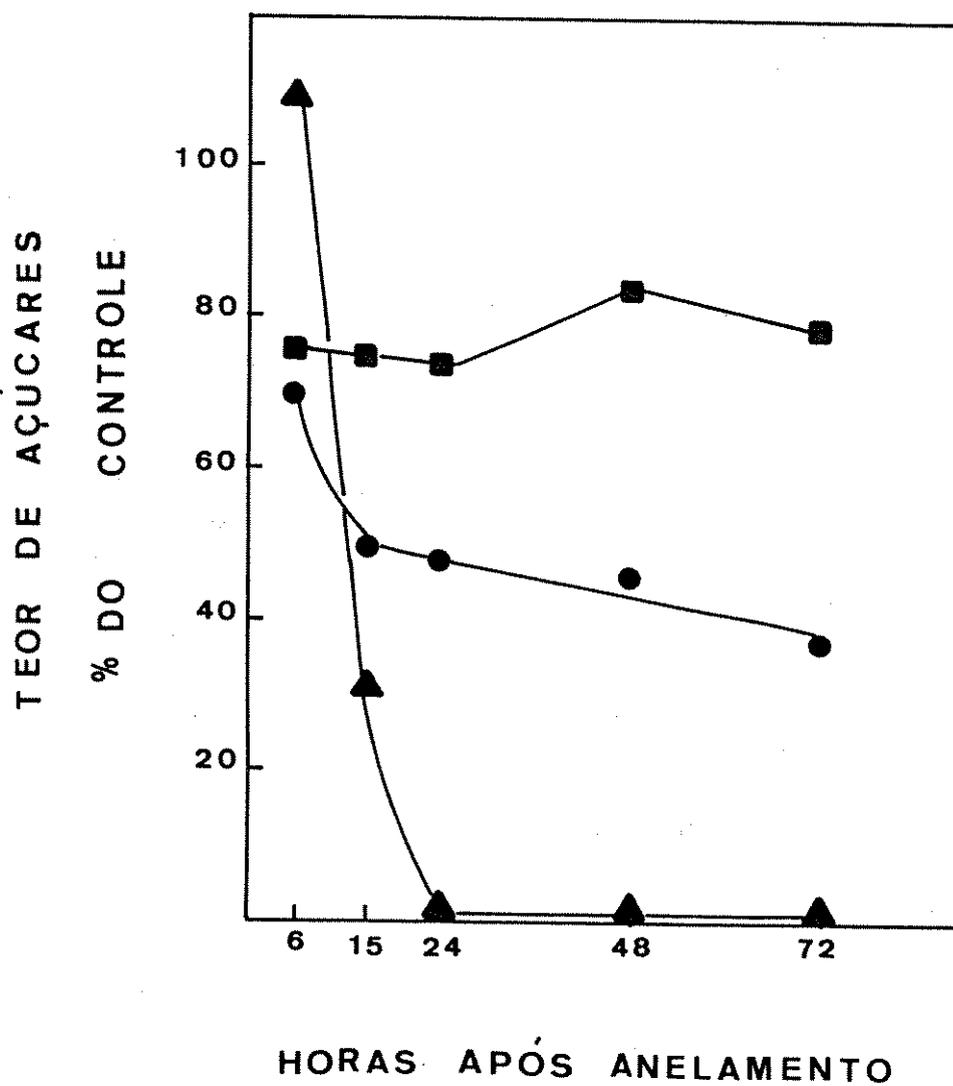


Fig. 9 - Variações nos teores de açúcares nas raízes, após o anelamento de plantas de café de 6 meses de idade. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle. Açúcares totais (●—●), sacarose (▲—▲), açúcares redutores (■—■).

verificaram em raízes excisadas de feijão que, provavelmente devido a diferenças na absorção de nitrato, houve um efeito diferencial entre a glicose e a frutose na indução da redutase de nitrato, embora o consumo de oxigênio, bem como a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ pela respiração, tenham ocorrido de maneira semelhante para os dois açúcares.

Foi observado que após a remoção da parte aérea ocorre um decréscimo na taxa de absorção de nitrato, que é parcialmente revertido pelo fornecimento exógeno de açúcar, indicando uma estreita dependência deste processo do contínuo fornecimento de assimilados da parte aérea (SCHRADER e THOMAS, 1981; HANISCH TEN CATE e BRETELER, 1981). Deste modo, o decréscimo na atividade da redutase de nitrato observado nas raízes das plantas aneladas poderia ter sido causado pela queda na absorção de nitrato. Entretanto tal sugestão pode ser questionada, pois, até 24 horas após o anelamento o teor de nitrato das folhas das plantas aneladas aumentou em relação às testemunhas (figura 7B), indicando que houve uma maior translocação de nitrato para a parte aérea, possivelmente em virtude da perda de atividade enzimática das raízes (figura 7A). Por outro lado, plantas deficientes em nitrogênio e que receberam nitrato após 48 horas de anelamento ainda exportavam nitrato para as folhas (figura 8), enquanto que a atividade da redutase de nitrato nas raízes era apenas 7% da atividade do controle.

Portanto, em plantas de café a redução de nitrato nas raízes é muito mais sensível às alterações nos níveis de açúcares nestes tecidos do que a absorção e transporte de nitrato para o xilema, confirmando resultados obtidos

em outras espécies (RADIN *et alii*, 1978; ASLAM e HUFFAKER, 1984; OAKS e HIREL, 1985).

3.5. Avaliação da redução de nitrato em folhas e raízes durante o desenvolvimento inicial das plantas

As variações no peso de matéria seca e na área foliar durante a ontogênese dos vários pares de folhas de plantas de café estão expressas nas figuras 10 e 11, respectivamente. Observa-se que o início do desenvolvimento das folhas, representado pela abertura do par de folhas cotiledonares, ocorreu nove semanas após o plantio das sementes (figuras 10 e 11). Comparando-se as curvas apresentadas nas figuras 10 e 11, verifica-se que, de modo geral, as folhas atingem a expansão máxima sete dias antes de atingirem os maiores valores de acumulação de matéria seca. Constatou-se, também, que pouco antes que um par de folhas se torne totalmente desenvolvido, um novo par já inicia a expansão, o que ocorre aproximadamente a intervalos de duas semanas.

O crescimento das plantas durante os primeiros seis meses de desenvolvimento é ilustrado na figura 12. Neste período as folhas apresentam maior taxa de acúmulo de matéria seca que o caule e as raízes, contribuindo em grande parte para o aumento do peso total da planta. Nas condições do experimento o crescimento das raízes poderia, em parte, ter sido limitado pelas dimensões dos sacos plásticos utilizados e abundante irrigação com solução nutritiva.

Os resultados das determinações da atividade da redutase de nitrato, durante o desenvolvimento de cada uma das folhas estão representadas na figura 13.

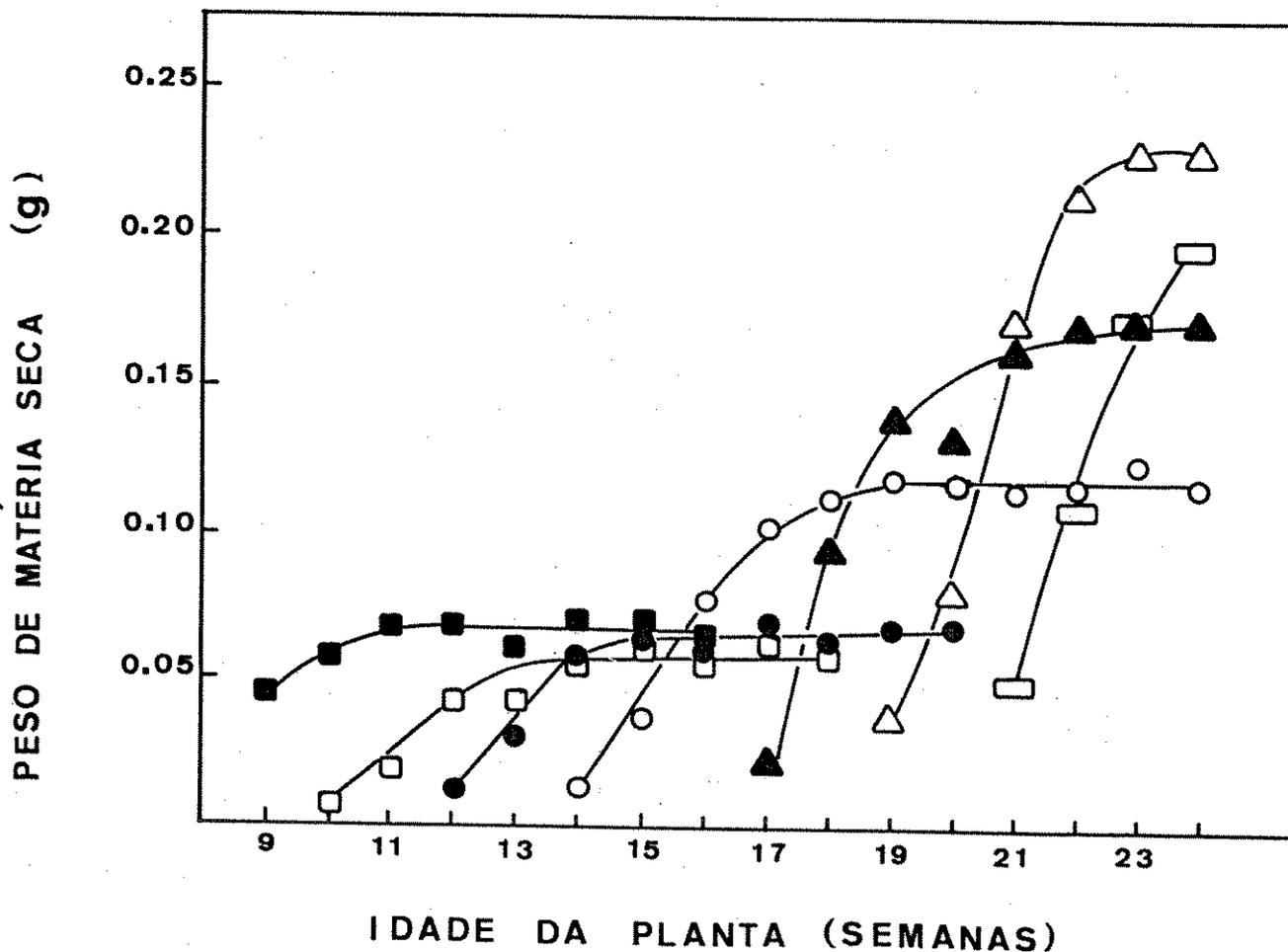


Fig. 10 - Peso de matéria seca dos vários pares de folhas (enumerados a partir da base do ramo ortotrópico) durante o desenvolvimento de plantas de café. Média de 5 repetições. Folhas cotiledonares (■-■), 1ª par (□-□), 2ª par (●-●), 3ª par (○-○), 4ª par (▲-▲), 5ª par (△-△), 6ª par (◻-◻).

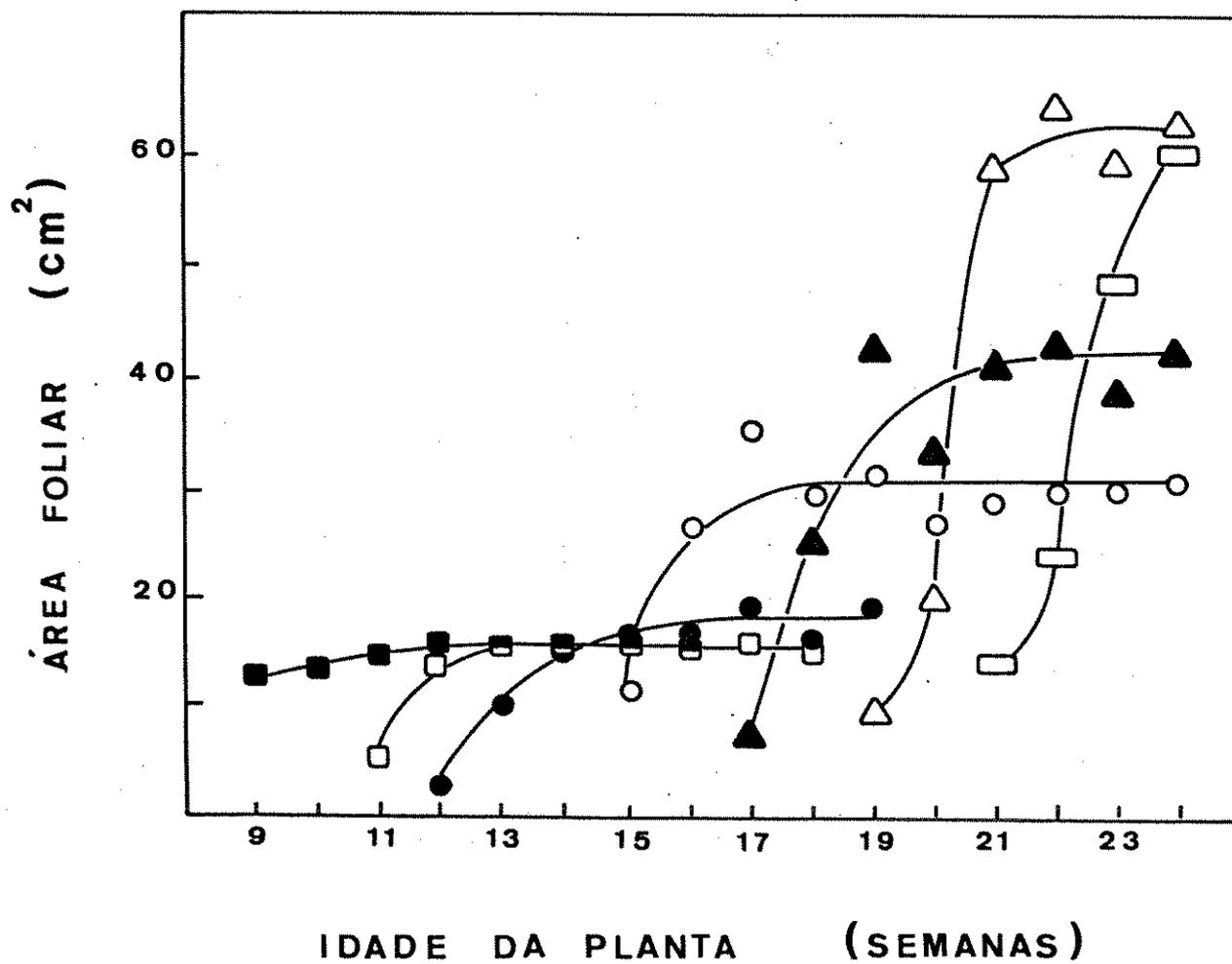


Fig. 11 - Área foliar dos vários pares de folhas (enumerados a partir da base do ramo ortotrópico), durante o desenvolvimento de plantas de café. Média de 5 repetições. Folhas cotiledonares (■-■), 1º par (□-□), 2º par (●-●), 3º par (○-○), 4º par (▲-▲), 5º par (△-△), 6º par (□-□).

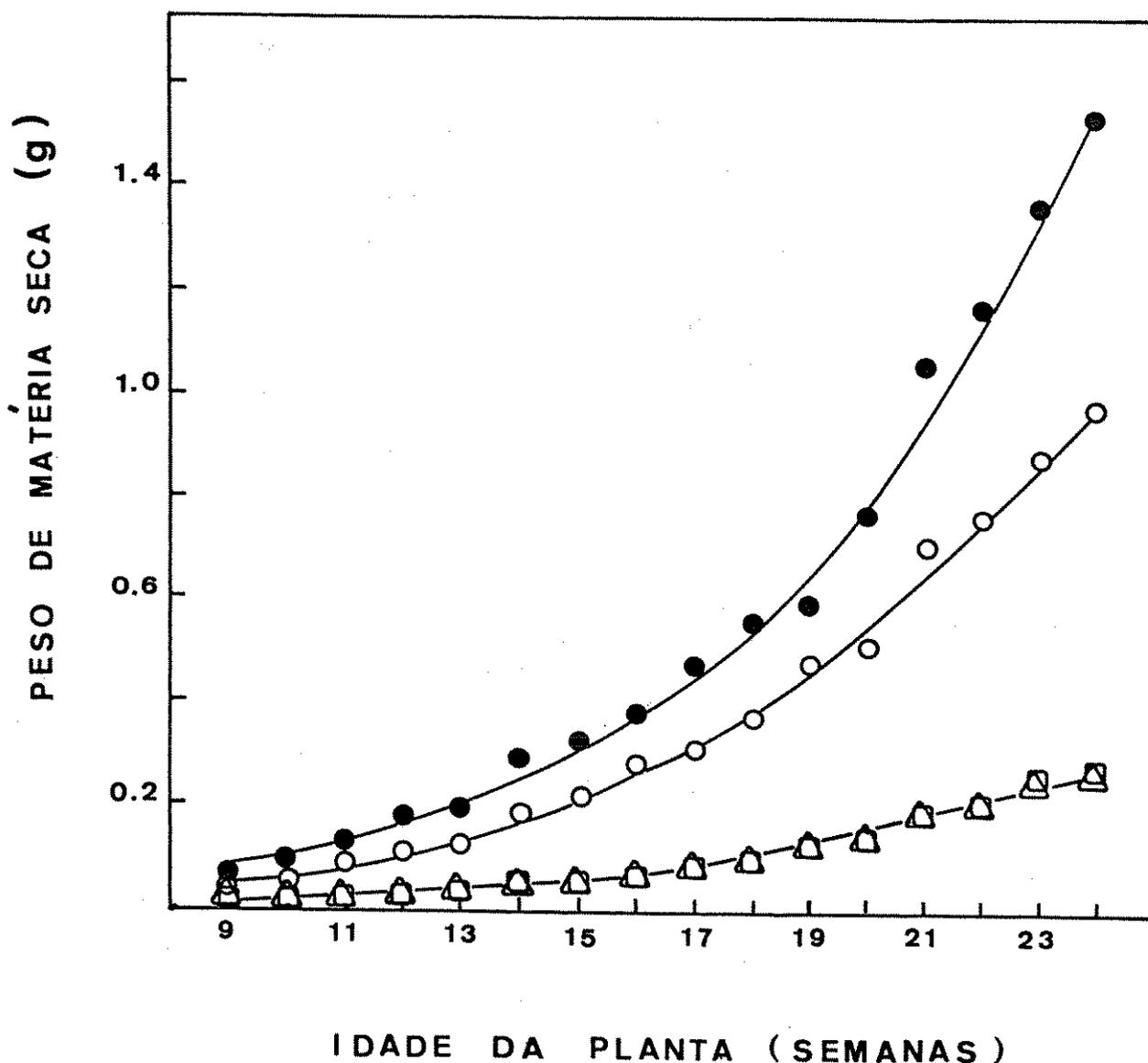


Fig. 12 - Variações no peso de matéria seca durante o desenvolvimento de plantas de café. Peso Total (●—●), peso das folhas (○—○), peso do caule (△—△), peso de raízes (□—□), Média de 5 repetições.

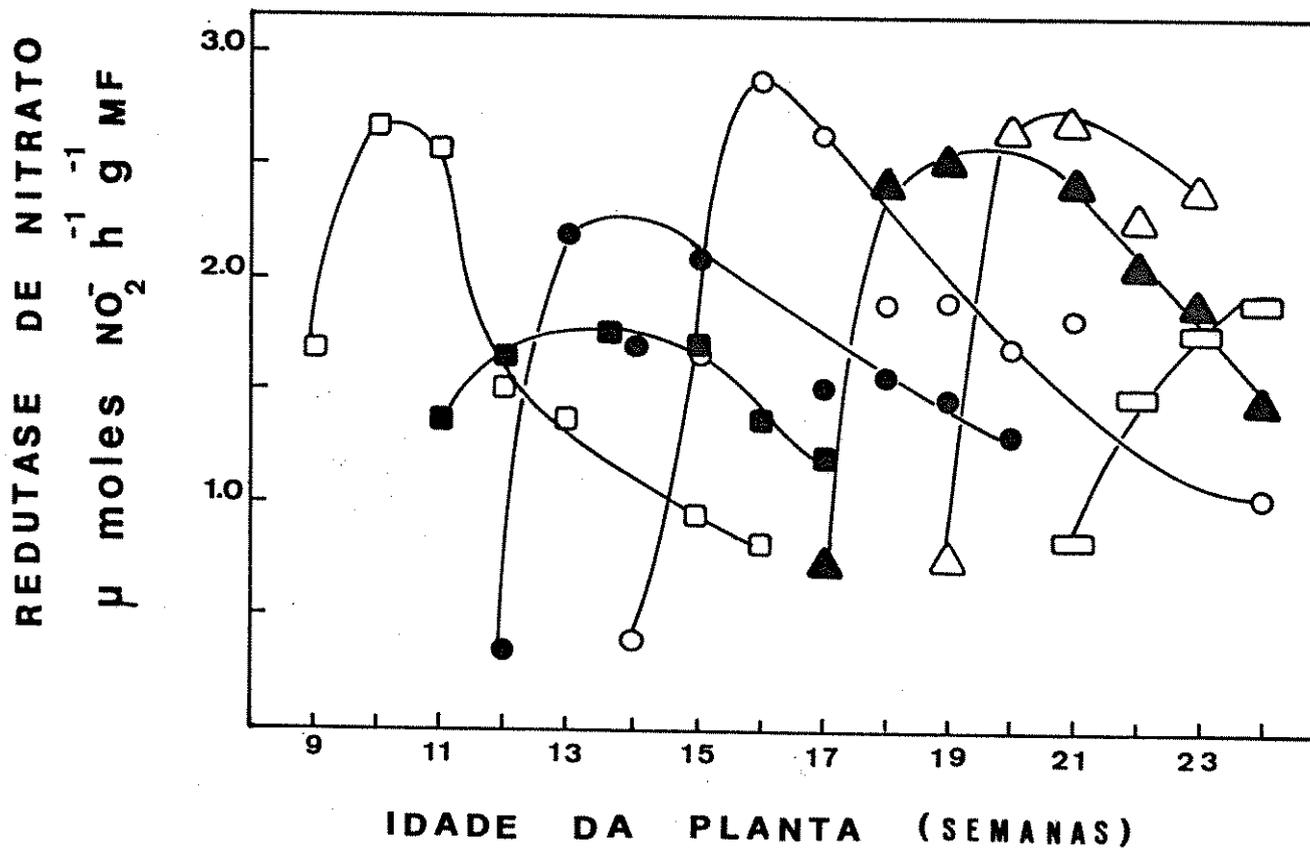


Fig. 13 - Acompanhamento da atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento dos vários pares de folhas (enumerados a partir da base do ramo ortotrópico) de plantas de café. Dados médios de 5 repetições. Folhas cotiledonares ($\square-\square$), 1ª par ($\blacksquare-\blacksquare$), 2ª par ($\circ-\circ$), 3ª par ($\circ-\circ$), 4ª par ($\blacktriangle-\blacktriangle$), 5ª par ($\triangle-\triangle$), 6ª par ($\square-\square$).

Pode ser observado que a atividade máxima na folha cotiledonar ("orelha de onça") ocorreu dez semanas após o plantio, decrescendo a seguir. A fase de aumento da atividade enzimática no 1º par de folhas coincidiu com o período de máxima atividade na folha cotiledonar. O mesmo padrão foi observado entre os 1º e 2º pares de folhas, e assim sucessivamente, indicando que há uma redistribuição de funções entre os diferentes tecidos clorofilados, que pode ser importante para a continuação do processo de crescimento da planta toda.

Comparando-se os resultados incluídos na figura 13 com aqueles representados nas figuras 10 e 11, pode ser observado que a redução de nitrato é baixa nas folhas em início de expansão, atinge valores máximos nas folhas quase que totalmente expandidas e declina posteriormente com a idade. Esses resultados confirmam os dados obtidos por MEGURO e MAGALHÃES (1982), que verificaram que a atividade da redutase de nitrato em folhas de cinco cultivares de café, foi mais baixa nas folhas mais jovens e aumentou em folhas fisiologicamente maduras.

Em plantas com 21 semanas de idade, a distribuição da atividade da redutase de nitrato nos vários pares de folhas, ao longo do ramo ortotrópico, assim como a contribuição específica de cada par para a atividade enzimática total da parte aérea, são apresentadas no quadro 3. Observa-se que o 5º par de folhas (enumerado a partir da base da planta), correspondente à folha mais jovem totalmente expandida, apresentou a mais alta atividade enzimática, expressa em gramas de peso de matéria fresca por hora, contribuindo com 42,7% da redução de nitrato da parte aérea. Os baixos pesos de

matéria fresca do 1º ao 3º pares de folhas, não significam que os mesmos não tenham atingido a expansão total, pois em plantas de café esses pares de folhas são normalmente bem menores do que os que se desenvolvem posteriormente.

Quadro 3. Distribuição da atividade da redutase de nitrato entre os vários pares de folhas, enumerados a partir da base do ramo ortotrópico, em plantas de café de 21 semanas de idade, e contribuição de cada par de folhas na atividade enzimática total da parte aérea. (Média de 5 repetições)

Tecido	Peso de Matéria Fresca (g)	Atividade da redutase de nitrato		
		μ moles NO_2^- $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$	μ moles NO_2^- $\text{h}^{-1} \text{tecido}^{-1}$	% total
1º par	0,2834	0,952	0,270	4,7
2º par	0,2705	1,203	0,325	5,7
3º par	0,4694	1,811	0,850	14,9
4º par	0,6751	2,411	1,628	28,6
5º par	0,9143	2,659	2,431	42,7
6º par	0,2270	0,810	0,184	3,2
Parte aérea	2,8397		5,688	100,0

O efeito da idade fisiológica de tecidos de folhas sobre a atividade da redutase de nitrato já foi demonstrado em diferentes espécies de plantas (AFRIDI e HEWITT, 1964; HARPER e HAGEMAN, 1972; FAIR *et alii*, 1973; SRIVASTAVA, 1975; CARELLI e MAGALHÃES, 1981; MEGURO e MAGALHÃES, 1982; OLIVEIRA, 1985).

O decréscimo na atividade enzimática que se manifesta com a idade da folha tem sido correlacionado com a capacidade dos tecidos de sintetizarem proteínas (WALLACE e PATE, 1965; BEEVERS e HAGEMAN, 1969; TRAVIS e KEY, 1971; BEEVERS, 1976). Por outro lado, KANNANGARA e WOOLHOUSE (1967) verificaram que a síntese da redutase de nitrato em folhas de *Perilla* foi maior em folhas mais jovens do que em folhas maduras e senescentes. Estes autores sugeriram que a síntese da enzima parece ser dependente da atividade fotossintética. Em plantas de café, as taxas de fotossíntese tendem a aumentar até a expansão total da folha, decrescendo a seguir com a idade (YAMAGUCHI e FRIEND, 1979; FAHL e CARELLI, 1984). Portanto, o mesmo par de folhas ao longo do perfil de uma planta jovem de café, apresenta as maiores taxas de fotossíntese e de redução de nitrato, indicando que a inter-relação entre esses dois processos pode ser um dos fatores que contribuem para o decréscimo na atividade enzimática que se verifica com o aumento da idade da folha. Esta hipótese, entretanto, não elimina outros fatores tais como a capacidade do tecido em sintetizar proteína. Ao contrário, é evidente que em folhas recentemente expandidas os principais processos metabólicos que resultam no crescimento atingem taxas máximas, que declinam posteriormente com a idade.

A atividade da redutase de nitrato analisada nas raízes mais jovens, oscilou durante o período de crescimento estudado (9-23 semanas) entre um mínimo de 1,21 (na 12^a semana) e um máximo de 2,49 μ moles de NO_2^- por hora, por grama de matéria fresca (na 15^a semana) (figura 14). Na figura 15 estão representados os valores de atividade da redutase de nitrato das raízes mais jovens e do par de folhas

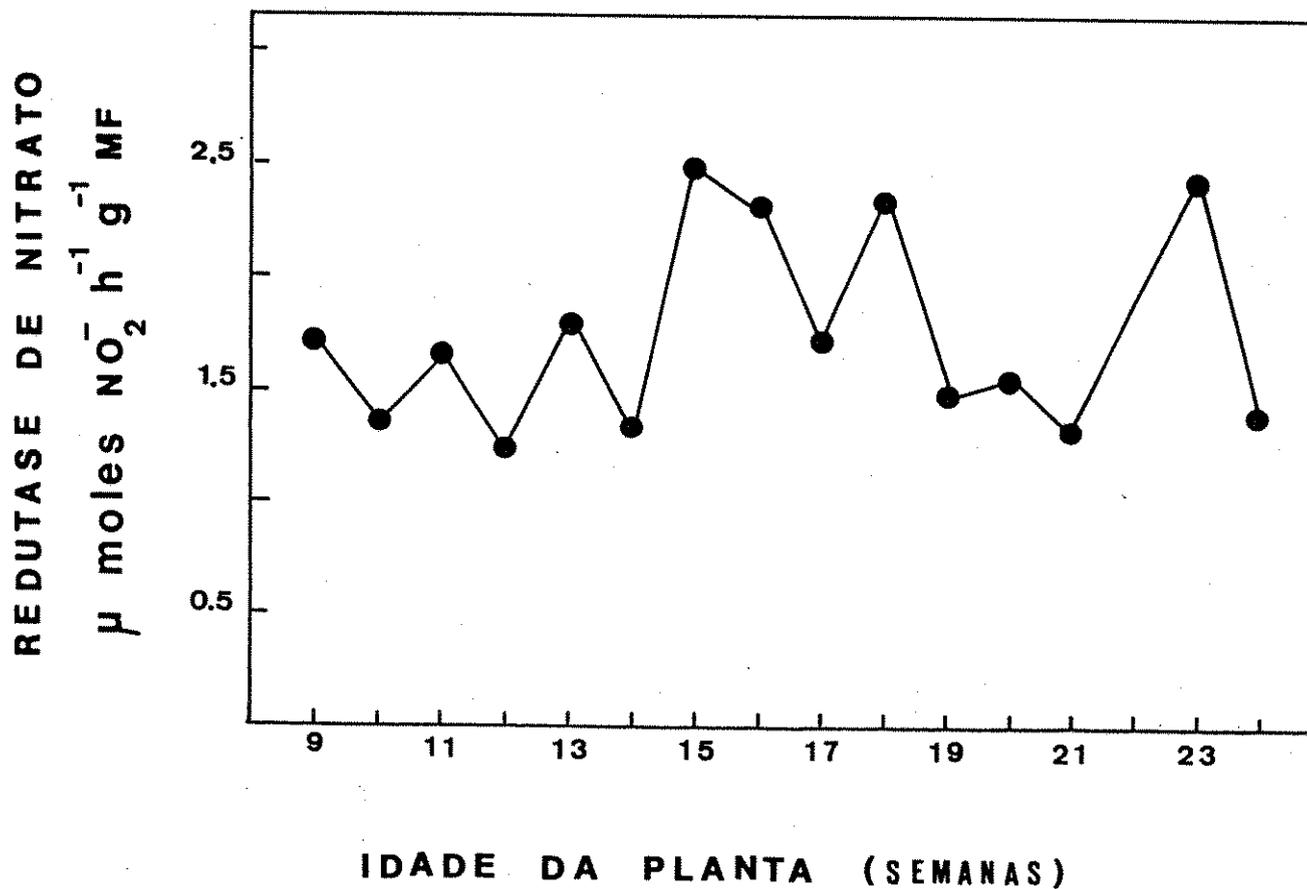


Fig. 14. - Atividade da redutase de nitrato nas raízes mais jovens, durante o desenvolvimento inicial de plantas de café. Dados médios de 5 repetições.

que apresentou o mais alto nível de atividade enzimática da parte aérea, em cada idade específica. Analisando-se os resultados verifica-se que, na maioria das amostragens, a atividade na raiz foi menor que na folha, sendo entretanto superior em algumas determinações. As variáveis responsáveis pela alternância na relação entre a atividade enzimática da folha e da raiz não foram precisamente detectadas neste trabalho.

A distribuição da atividade da redutase de nitrato, entre a raiz e a parte aérea, pode variar com a concentração de nitrato no meio externo e com as condições ambientais (PATE, 1973, 1980). De um modo geral, se grandes quantidades de nitrato são fornecidas ao meio radicular, poderá ocorrer uma saturação do sistema de redução de nitrato nas raízes que, conseqüentemente, exportarão mais nitrato para as folhas, onde ocorre sua assimilação (WALLACE e PATE, 1965; PATE, 1980), SUTHERLAND *et alii*, 1985). No presente trabalho, este importante fator poderia em parte ser afastado, pois as plantas foram sempre irrigadas com solução nutritiva contendo a mesma concentração de nitrato. Entretanto, parecem existir flutuações sazonais na concentração de nitrato na seiva do xilema de espécies lenhosas, sendo que esta concentração poderia afetar a indução da redutase de nitrato nas folhas (FERGUSON *et alii*, 1983; SMIRNOFF *et alii*, 1984). Portanto, as variações nas condições ambientais, assim como a variabilidade das plantas, poderiam ser apontadas como possíveis causas da alternância da relação da atividade enzimática folha/raiz ocorridas durante o desenvolvimento das plantas de café.

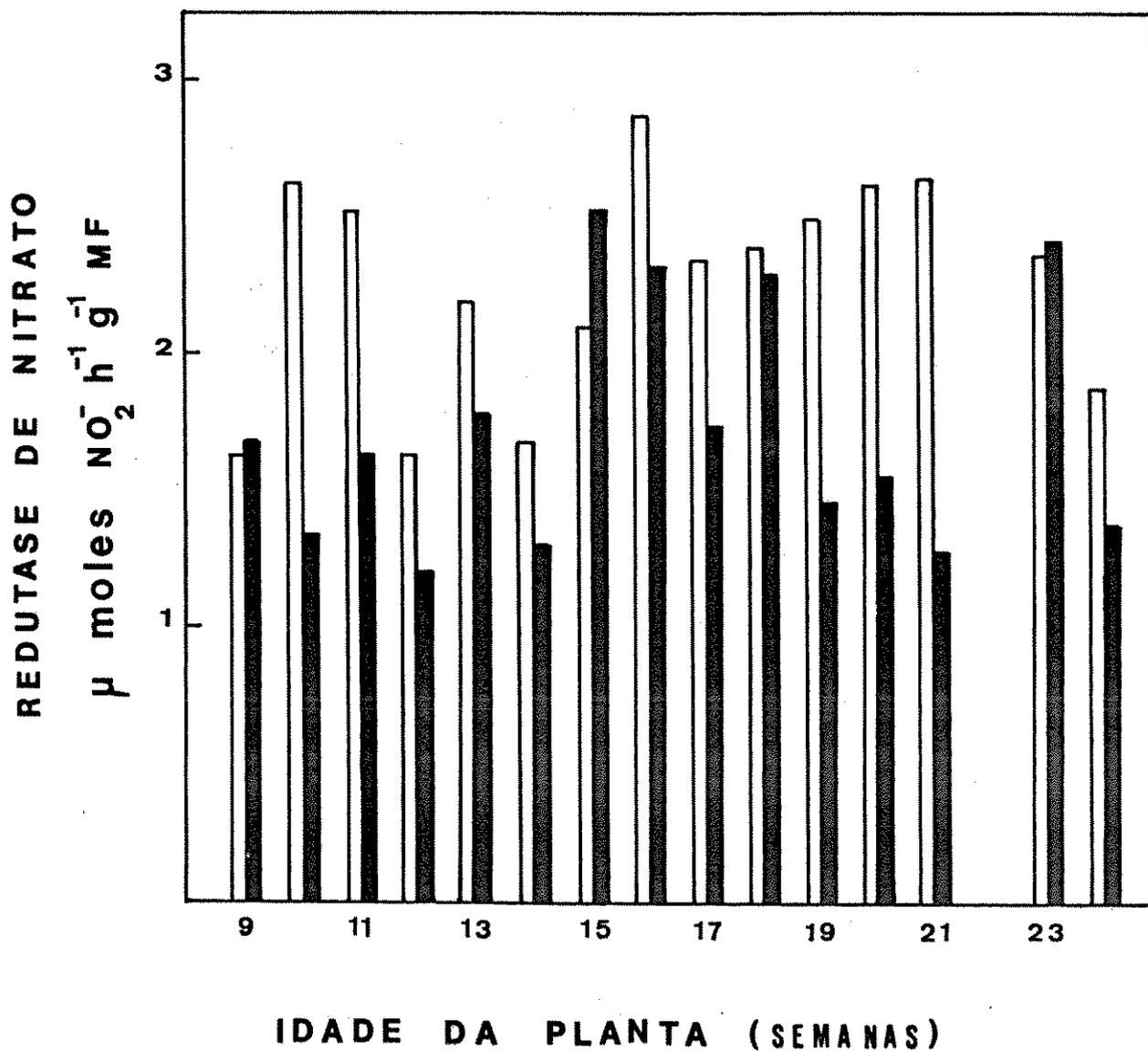


Fig. 15 - Comparação entre as atividades da redutase de nitrato da folha com máxima atividade e das raízes mais jovens, durante o desenvolvimento de plantas de café, cultivadas em areia e irrigadas com solução 15mM de nitrato.

□ - Folhas

■ - Raízes

Considerando-se os valores médios de todas as análises efetuadas durante o crescimento das plantas, as atividades da redutase de nitrato da raiz e da folha foram 1,72 e 2,27 μ moles NO_2^- por hora, por grama de matéria fresca, respectivamente.

A atividade da redutase de nitrato "in vivo" relativamente alta observada nas raízes não foi devido à contaminação microbiana. Embora as plantas tenham sido conduzidas em meio não estéril, amostras da areia aderida às raízes das plantas foram analisadas de modo idêntico ao tecido vegetal, não se observando qualquer atividade enzimática indicativa de atividade microbiana. SANDERSON e COCKING (1964), trabalhando com plantas de tomate, e WALLACE e PATE (1965) em ervilha, demonstraram que a atividade da redutase de nitrato em raízes de plantas intactas, cultivadas em areia não estéril, foi tão alta quanto a obtida em sistemas esterelizados.

A maioria das espécies herbáceas, incluindo importantes culturas econômicas como algodão (RADIN *et alii*, 1975; RADIN, 1977), cevada (CHANTAROTWONG *et alii*, 1976; ASLAM e HUFFAKER, 1982; LEWIS *et alii*, 1982), soja (CRAFTS-BRANDNER e HARPER, 1982), e milho (HAGEMAN e FLESHER, 1960; WALLACE, 1973), reduzem a maior parte do nitrato absorvido nas folhas. Por outro lado, grande parte das espécies lenhosas, particularmente aquelas associadas a povoamentos florestais (KRAMER e KOZLOWSKI, 1979; PATE, 1973, 1980) e membros da família *Rosaceae* (BOLLARD, 1956, 1957) parecem reduzir a maior quantidade de nitrato em suas raízes, transportando

para a parte aérea altos níveis de solutos nitrogenados orgânicos. Entretanto, mais recentemente, evidências baseadas na determinação de alta atividade da redutase de nitrato nas folhas de plantas lenhosas tem sugerido que em adequados níveis de nitrato, a translocação e conseqüente redução podem ocorrer eficientemente nestes tecidos (KLEPPER e HAGEMAN, 1969; ADAMS e ATTIWILL, 1982; SMIRNOFF *et alii*, 1984; SMIRNOFF e STEWART, 1985).

Em plantas de café cultivadas em solução 15 mM NO_3^- , ficou demonstrado que a redução de nitrato ocorre tanto nas raízes como na parte aérea. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as raízes contribuem significativamente na assimilação de nitrato pela planta, não só satisfazendo suas exigências em nitrogênio reduzido, como possivelmente transportando metabólitos nitrogenados orgânicos para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea. Em condições de campo, onde os níveis de nitrato do solo são frequentemente mais baixos do que o utilizado neste trabalho, possivelmente as raízes desempenhem um papel ainda mais relevante no processo de assimilação de nitrato pela planta.

3.6. Redução de nitrato em plantas adultas - Alterações ontogênicas

3.6.1. Atividade da redutase de nitrato durante a fase reprodutiva

A avaliação dos estádios referentes à fase reprodutiva das plantas utilizadas neste trabalho é apresentada no quadro 4. Segundo GOUVEIA (1984), em seus estudos

sobre o florescimento e desenvolvimento de frutos de café, os cafeeiros em 1982 apresentaram quatro floradas na região de Campinas: a primeira em 22 de agosto, a segunda em 29 de agosto, a terceira em 29 de setembro e a quarta (principal) em 10 de outubro, que foram responsáveis, respectivamente por 6,1, 11,0, 16,7 e 47,1% do total de flores abertas. No presente trabalho, conduzido em solução nutritiva, a florada principal ocorreu em 8 de outubro de 1982, apresentando uma defasagem de apenas dois dias em relação às plantas cultivadas no campo. Portanto, as datas das três floradas precedentes, assim como outros dados obtidos por GOUVEIA (1984) foram utilizados para complementar as avaliações contidas no quadro 4, com a finalidade de estimar mais precisamente o estágio de desenvolvimento das flores e frutos.

Os resultados referentes à atividade da redutase de nitrato durante a fase reprodutiva de plantas de café são apresentados na figura 16. Os valores máximos de atividade enzimática foram obtidos em 23 de setembro e 10 de fevereiro, ocasiões estas que correspondem, respectivamente, à fase anterior à antese (florada principal) e à fase final de expansão dos frutos. As atividades mais baixas ocorreram quando as inflorescências estavam na fase inicial e intermediária de desenvolvimento (agosto) e durante o início de expansão dos frutos (outubro e janeiro).

Quadro 4. Altura do caule, número de pares de ramos plagiotrópicos e estimativa da evolução das estruturas florais durante a fase reprodutiva de plantas de café. (Média de 5 plantas)

Data	Altura (cm)	Pares de Ramos	Distribuição percentual						
			Gemas Florais	Botões Florais	Flores Abertas	Frutos*			
						1	1-3	3-6	> 6
23/09/82	69	15	75	13	6	6	-	-	-
07/10/82	70	16	7	72	0	21	-	-	-
13/10/82	70	16	2	4	54	40	-	-	-
26/10/82	72	17	6	2	-	70	14	8	-
09/11/82	73	17	9	-	-	64	18	9	-
01/12/82	80	18	-	-	-	14	42	34	10
15/12/82	81	19	-	-	-	11	27	41	21
03/01/83	82	19	-	-	-	2	21	31	46
02/03/83	85	21	-	-	-	-	-	-	100

* diâmetro em mm.

Florada principal - 08/10/82

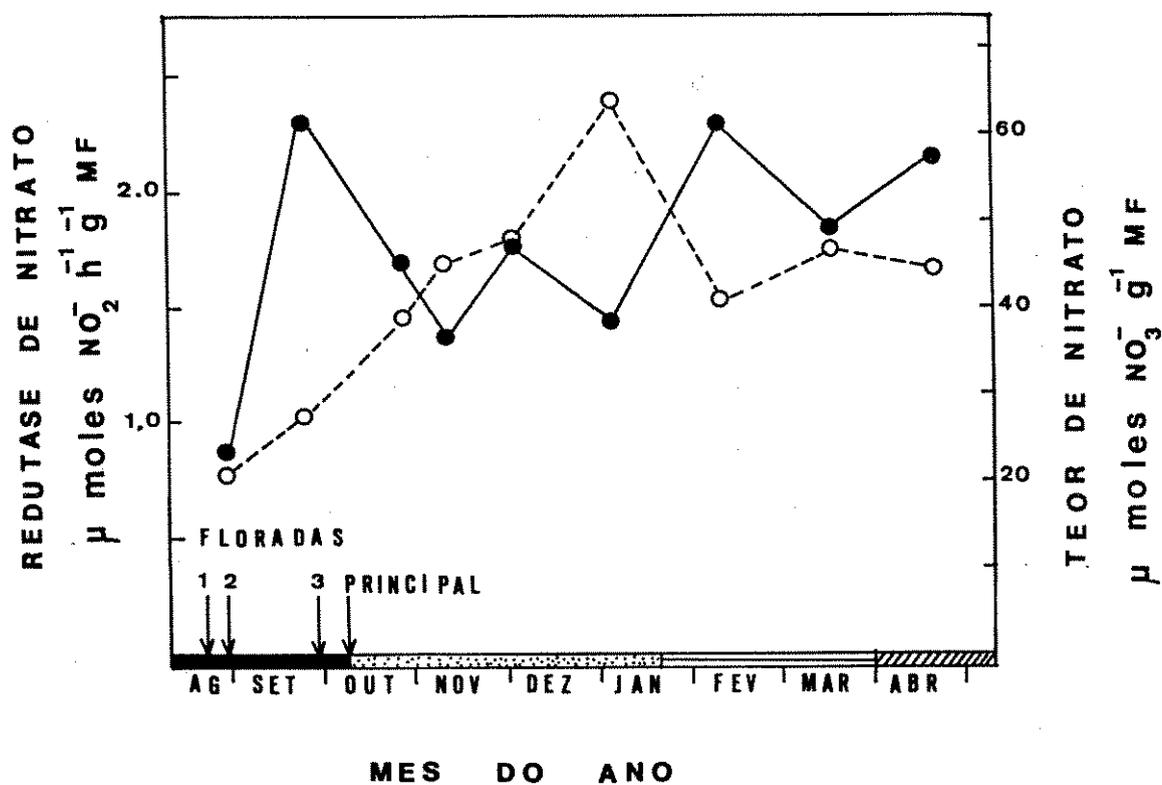


Fig. 16 - Atividade da redutase de nitrato (●—●) e teor de nitrato (O---O), nas folhas, durante o ciclo reprodutivo de plantas de café de aproximadamente dois anos de idade, cultivadas em solução nutritiva. Dados médios de 5 plantas.

- Florescimento
- ▤ Expansão dos frutos
- ▨ Formação do endosperma - granação
- ▧ Maturação

Segundo FREDERICO e MAESTRI (1970), os botões florais de café, após um período inicial de crescimento, passam por um período variável de dormência. Após a quebra da dormência os verticilos florais se expandem rapidamente até à antese, apresentando um aumento de matéria seca de 500% em relação aos botões dormentes (BARROS *et alii*, 1982). Nesse período é necessário um rápido transporte de substâncias orgânicas para os botões florais e a fotossíntese corrente é muito mais importante para o crescimento da flor do que as reservas armazenadas, tanto nas folhas como no lenho dos ramos (BARROS *et alii*, 1982). De modo semelhante, a atividade da redutase de nitrato aumentou consideravelmente na fase final de desenvolvimento da flor, indicando que os processos anabólicos das folhas tornam-se mais intensos a fim de suprir as demandas de metabólitos durante este estágio fisiológico (figura 16, BARROS *et alii*, 1982).

Nas primeiras 5-6 semanas posteriores à antese, os frutos não apresentam crescimento visível, sendo denominados "chumbinhos" (WORMER e NJUNGUNA, 1966). Após esse tempo os frutos se expandem rapidamente, acumulando cerca de 80% de água e atingindo o tamanho máximo ao redor da 16^a semana após a abertura das flores (CANNELL, 1975). Neste período em que a expansão dos frutos se processa devido ao acúmulo de água, a atividade da redutase de nitrato oscilou em torno de níveis mais baixos que o anterior.

Durante e imediatamente após a expansão final dos frutos (12^a a 20^a semanas após a antese) são formados os tecidos do endosperma das sementes, que atuam como poderosos drenos de carboidratos e minerais (CANNELL, 1975). A atividade da redutase de nitrato aumentou consideravelmente no

início da formação do endosperma, oscilando a seguir em níveis elevados, durante a fase de acúmulo de matéria seca (granação) nas sementes.

O cafeeiro apresenta alterações na taxa de absorção de nutrientes associados aos estádios fisiológicos mais importantes do ciclo anual da planta. A taxa de absorção de nitrato em plantas adultas de café, cultivadas em solução nutritiva, apresentou valores maiores antes da antese e no início da maturação dos frutos, decrescendo consideravelmente após o florescimento (CARVAJAL *et alii*, 1969). A atividade da redutase de nitrato apresentou aproximadamente as mesmas variações verificadas por CARVAJAL *et alii* (1969), na taxa de absorção de nitrato, indicando que a modulação do fluxo deste íon pode ter se constituído em importante fator no controle da atividade enzimática durante o ciclo da planta. Assim, verifica-se que os maiores valores de atividade da redutase de nitrato, durante o ciclo das plantas de café em produção, são coincidentes com as fases de maior demanda de metabólitos e, à semelhança da absorção e distribuição de nutrientes (CARVAJAL *et alii*, 1969; CANNELL e KIMEU, 1971) e da produção e distribuição de matéria seca (CANNELL, 1971; CANNELL e HUXLEY, 1969), são fortemente influenciados pela presença de flores e frutos.

TALEISNIK *et alii* (1980) verificaram que a atividade da redutase de nitrato em plantas de café cultivadas no campo apresentou variações sazonais que foram correlacionadas com o teor de água do solo e das folhas. Aqueles autores constataram que a atividade enzimática foi mais alta durante a estação seca que coincidiu com o florescimento e maturação.

As plantas cultivadas em solução nutritiva podem apresentar variações no balanço hídrico, associadas à alta demanda transpiratória e ao desenvolvimento de grandes resistências ao fluxo da água entre a raiz e a parte aérea (CANNELL, 1975). Entretanto, outros fatores ambientais como o teor de nitrato do meio, luz e temperatura, poderiam estar interferindo nas variações verificadas na atividade da redutase de nitrato.

O teor de nitrato da solução nutritiva na qual as plantas foram cultivadas foi mantido aproximadamente constante durante todas as épocas de amostragens, oscilando entre 10,0 e 11,8 μ moles de NO_3^- por ml de solução.

Na figura 17A e B são apresentados os dados climáticos referentes aos números de horas de insolação, e às temperaturas máximas registradas em Campinas no dia anterior e no próprio dia das amostragens (dados fornecidos pela Seção de Climatologia Agrícola do IAC). Foram consideradas apenas as temperaturas máximas pois estas são as mais prejudiciais, tanto para a redução de nitrato (CASTILLO VALE, 1974; citado por TALEISNIK *et alii*, 1980) como para a fotossíntese (NUNES *et alii*, 1968; KUMAR e TIESZEN, 1980) de plantas de café.

Os dois maiores valores da atividade da redutase de nitrato, observados em setembro e fevereiro (figura 16), coincidiram com os menores números de horas de insolação e com as temperaturas máximas mais amenas registradas no dia anterior ao das análises (figura 17A e B). Em adição, as menores atividades enzimáticas (agosto e novembro) também foram relacionadas com os maiores números de horas de insolação, medidos nos dias anteriores às amostragens. Não

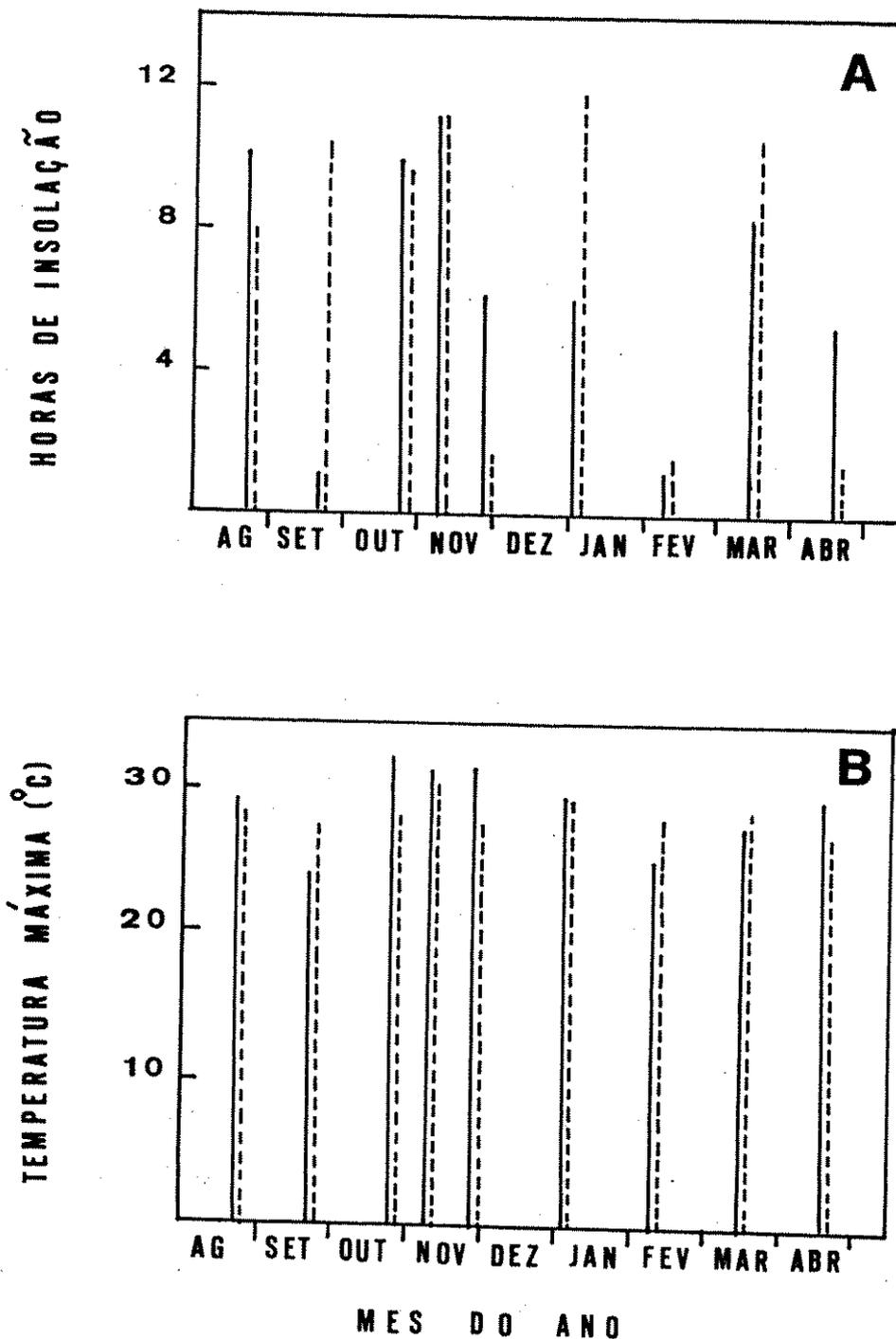


Fig. 17 - Dados climáticos referentes ao número de horas de insolação (A) e às temperaturas máximas (B) registradas no Centro Experimental de Campinas no dia anterior (—) e no próprio dia (-----) de todas as determinações. (Dados fornecidos pela Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agrônomo de Campinas).

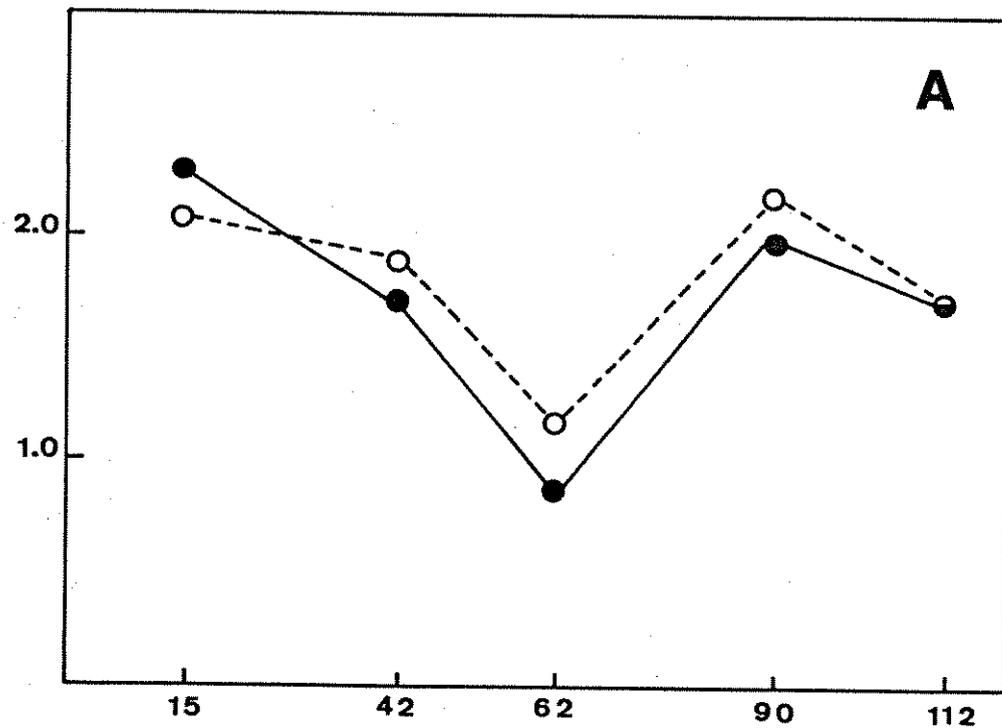
foi observada relação entre a atividade enzimática e as condições climáticas determinadas no próprio dia da análise. Esses resultados reforçam a sugestão apresentada no item 3.2 deste trabalho, na qual a redutase de nitrato utilizaria preferencialmente a energia liberada na oxidação dos carboidratos, e não diretamente da fotossíntese corrente.

3.6.2. Atividade da redutase de nitrato em folhas de ramos submetidos a remoção parcial ou total das flores

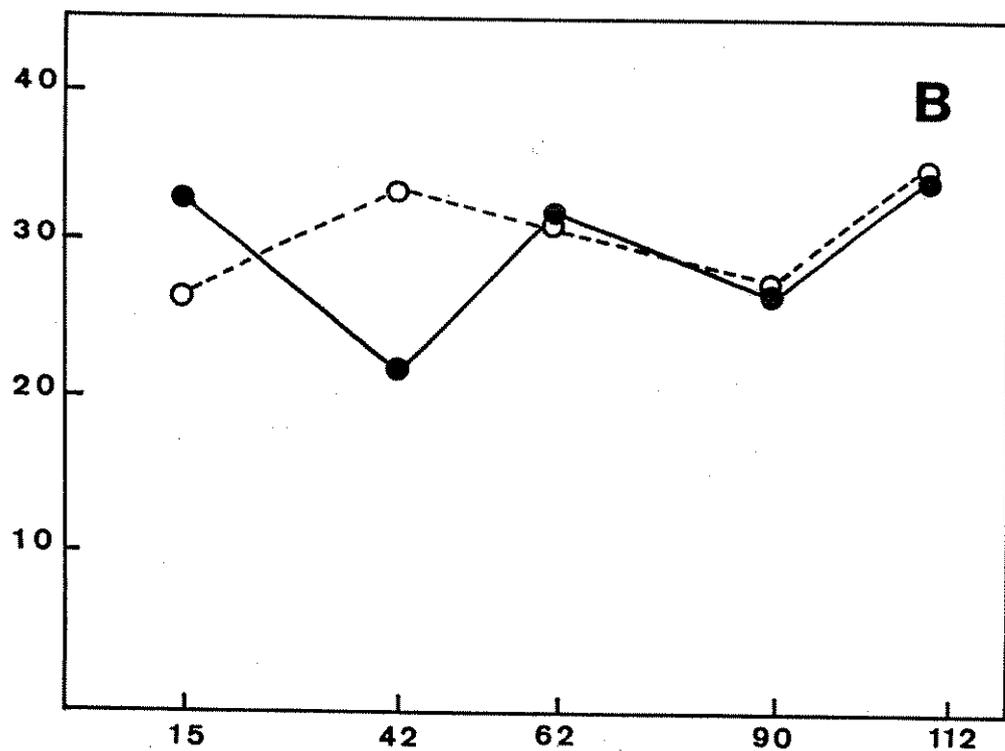
Como mostra a figura 18A e B, a remoção de 50% das flores dos ramos por ocasião da florada principal, pouco alterou a atividade da redutase de nitrato e o teor de nitrato das folhas, durante a fase posterior de desenvolvimento dos frutos, quando comparados com os das folhas dos ramos que não sofreram desbaste. Este fato é perfeitamente justificável uma vez que tanto os botões florais (BARROS *et alii*, 1982) como os frutos (CANNELL, 1975) são capazes de utilizar metabólitos acumulados em tecidos situados em posições distantes, acima ou abaixo no mesmo ramo.

Entretanto, a remoção de todas as flores do ramo afetou a atividade da redutase de nitrato, em relação aos ramos sem desbaste (figura 19A). Nas folhas dos ramos contendo os frutos em desenvolvimento, a atividade enzimática foi sempre superior à dos ramos que foram mantidos sem frutos. TALEISNIK *et alii* (1980) também verificaram que a atividade da redutase de nitrato na parte média (com frutos) de plantas de café foram maiores que a da parte superior (sem frutos). CANNELL (1971) observou que a taxa de assimilação

REDUTASE DE NITRATO
 μ moles $\text{NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$



TEOR DE NITRATO
 μ moles $\text{NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{MF}$



DIAS APÓS A REMOÇÃO DAS FLORES

Fig. 18 - Atividade da redutase de nitrato (A) e teor de nitrato (B) nas folhas de ramos de café com frutos (O---O) e nas folhas de ramos que foram submetidos ao desbaste de 50 % das flores (●—●), durante o período de crescimento dos frutos. O tempo zero corresponde à época da florada principal, quando foi efetuado o tratamento de remoção das flores. Dados médios de 5 repetições.

líquida em cafeeiros com frutos foi muito maior do que a de plantas desbastadas (sem frutos), mostrando que as folhas das plantas com frutos tem maiores taxas fotossintéticas do que aquelas sem frutos.

Os teores de nitrato acompanharam a mesma tendência da atividade enzimática, ou seja, as folhas dos ramos com frutos apresentaram maiores valores do que aqueles dos ramos desbastados (figura 19B). Esses resultados confirmam os obtidos por TALEISNIK *et alii* (1980) mostrando que de um modo geral, durante todo o ciclo das plantas, os teores de nitrato das folhas dos ramos com frutos foram superiores aos dos ramos sem frutos. CANNELL e KIMEU (1971) verificaram que plantas de café com frutos apresentaram taxas mais elevadas de absorção de N, P, K e Mg, e concluíram que estes foram prontamente metabolizados pelos frutos, os quais eventualmente drenaram esses minerais das folhas e/ou das partes lenhosas.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a presença de frutos induz maior demanda de metabólitos, evidenciada pela maior atividade da redutase de nitrato. O maior teor de nitrato, nas folhas dos ramos com frutos, indicam que existe um direcionamento preferencial do fluxo de nutrientes absorvidos para os ramos que se constituem em maior fonte de consumo.

As oscilações na atividade da redutase de nitrato durante o ciclo da planta foram bem mais acentuadas nas folhas dos ramos com frutos (figura 19A; TALEISNIK *et alii*, 1980), indicando que a enzima é fortemente influenciada na sua atividade, pelo estágio fisiológico ou ontogenia de plantas de café.

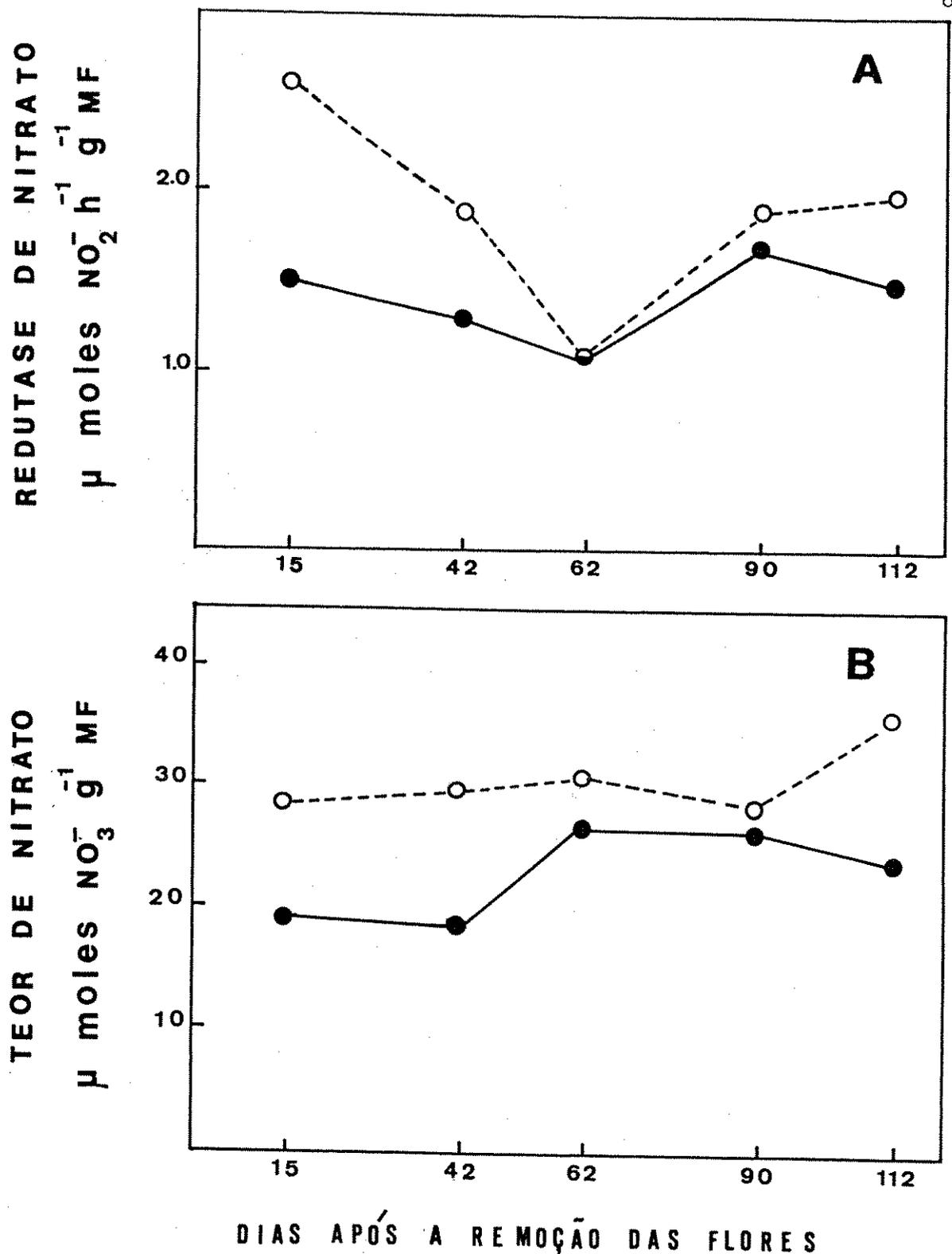


Fig. 19 - Atividade da redutase de nitrato (A) e teor de nitrato (B) nas folhas de ramos de café com frutos (O---O) e nas folhas de ramos que foram submetidos ao desbaste de todas as flores (●—●), durante o período de crescimento dos frutos. O tempo zero corresponde à época da florada principal, quando foi efetuado o tratamento de remoção das flores. Dados médios de 5 repetições.

4. RESUMO

A distribuição da atividade da enzima redutase de nitrato "in vivo", foi estudada em folhas e raízes de plantas jovens de café, cultivadas em areia, em casa de vegetação e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland.

A otimização da metodologia para a análise da redutase de nitrato "in vivo" nas raízes mostrou que os valores máximos foram obtidos quando se utilizou como meio de incubação uma solução tampão de fosfato 0,1M , pH 8,0 , em KNO_3 50mM. Verificou-se que existe uma relação linear entre a taxa de efluxo dos íons nitrito, resultante da redução de nitrato, e o tempo de ensaio compreendido entre 15 e 45 minutos de reação, que foram então padronizados para a retirada das alíquotas. O borbulhamento contínuo de N_2 , durante a análise da redutase de nitrato, aumentou em média 1,3 e 7,5 vezes, respectivamente as atividades enzimáticas das folhas e das raízes, em relação ao controle, sem N_2 . A atividade da redutase de nitrato, determinada nas raízes mais jovens, foi em média 2,4 vezes maior do que a das seções mais maduras, independente do estágio de desenvolvimento das plantas estudadas.

Ao contrário do observado na grande maioria das espécies, a atividade da redutase de nitrato, tanto nas folhas como nas raízes de plantas jovens de café, decresceu durante as horas de luz e aumentou no período escuro. O decréscimo observado no período luminoso aparentemente não foi devido a limitações na taxa de fotossíntese ou na disponibilidade de nitrato, sugerindo que a redutase de nitrato nas folhas utilizaria, preferencialmente, a energia liberada na oxidação dos carboidratos anteriormente produzidos. A redução de nitrato no escuro foi maior nas raízes do que nas folhas, havendo uma inversão do processo na luz. Tal fato sugere que, durante o período escuro poderia haver maior translocação de fotossintetizados para as raízes, e consequentemente, maior disponibilidade de energia para a redução de nitrato.

A absorção de nitrato em plantas deficientes em nitrogênio foi caracterizada por uma taxa inicial mais baixa que aumentou posteriormente, evidenciando a natureza indutiva deste processo. A redutase de nitrato foi rapidamente induzida nas folhas e nas raízes, logo nas primeiras horas de fornecimento de nitrato as plantas, sendo que os maiores níveis de atividade foram obtidos nas raízes. As folhas e raízes mostraram padrões semelhantes de acúmulo de nitrato demonstrando uma eficiente translocação do íon para a parte aérea.

A atividade da redutase de nitrato nas raízes de plantas que sofreram anelamento (bloqueio de floema) declinou rapidamente, os teores de açúcares totais e redutores apresentaram pequenas variações, enquanto que a sacarose decresceu drasticamente, acompanhando a queda na atividade

enzimática. Esses resultados sugerem que o processo de redução de nitrato nas raízes de plantas de café é bastante dependente do contínuo fornecimento de carboidratos pela parte aérea, e que as reservas presentes nas raízes não são suficientes para manter a atividade da redutase de nitrato em níveis adequados. Nas folhas a atividade enzimática mostrou decréscimos moderados com o anelamento das plantas, possivelmente em virtude da queda na disponibilidade de nitrato, através da inibição da absorção pelas raízes.

Durante o desenvolvimento das plantas de café, a fase de aumento da atividade da redutase de nitrato no primeiro par de folhas coincidiu com a fase de máxima atividade nas folhas cotiledonares. O mesmo padrão foi observado na etapa seguinte de crescimento, na qual o decréscimo na atividade do primeiro par foi acompanhado do aumento na atividade do segundo par, e assim sucessivamente. A mais alta atividade foi sempre obtida no par de folhas recentemente expandido, que contribuiu com 42,7% da redução de nitrato da parte aérea. A atividade da redutase de nitrato nas raízes oscilou durante todo o período de crescimento estudado. Na maioria das amostragens a atividade enzimática na raiz foi menor do que na folha, sendo superior em algumas determinações.

Neste trabalho também foi avaliado o comportamento da atividade da redutase de nitrato durante todo o ciclo produtivo de plantas de café, cultivadas em solução de Hoagland, em condições ambientes de luz e temperatura. Os valores máximos nas folhas foram obtidos durante a fase anterior à antese (florada principal), e no final da expansão

dos frutos (formação do endosperma das sementes), ocasiões estas que coincidem com períodos de intensa demanda de metabólitos pelas flores e frutos.

O desbaste de 50% das flores dos ramos por ocasião da florada principal pouco alterou o padrão de comportamento da atividade da redutase de nitrato e do teor de nitrato das folhas. A remoção de todas as flores do ramo provocou decréscimos na atividade enzimática e no teor de nitrato das folhas, em relação aos ramos sem desbaste. Tais resultados sugerem que a presença de frutos induz maior demanda de metabólitos e nutrientes.

PARTITIONING OF NITRATE REDUCTION IN YOUNG COFFEE PLANTS
AND IN ADULT PLANTS DURING THE REPRODUCTIVE STAGE

5. ABSTRACT

The distribution of the "in vivo" nitrate reductase activity in leaves and roots of young coffee plants and in leaves of adult plants during the reproductive stage were studied.

The young plants were cultivated in sand irrigated with nutrient solution in the greenhouse. The adult plants were cultivated in hydroponics, in ambient conditions.

The modified assay of the "in vivo" root nitrate reductase showed higher values of activity when the tissues were incubated in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, and 50 mM KNO_3 , under continuous N_2 bubbling, in the dark. With this procedure enzyme activity was 7,5 times higher compared with the control without N_2 . Young roots sections reduced nitrate 2.4 times more efficiently than mature sections, independently of the stage of development of the plant.

In young plants, the activity of nitrate reductase in both roots and leaves decreased during the light period and increased in the dark. The observed inhibition

of nitrate reduction under illumination apparently was not due to limitation of photosynthesis and nitrate availability, and suggested that the nitrate reductase reaction would utilize metabolic energy derived from the oxidation of carbohydrate pools.

In the dark, nitrate reduction was higher in the roots than in the leaves, the pattern being reversed in the light. It is conceivable that photosynthate transport to the roots might be stimulated in the dark, supplying energy for the reduction process.

Nitrate absorption in nitrogen deficient plants occurred at lower initial rate, and increased during the course of the experiment that lasted 8 hours, suggesting an inductive process. The induction of nitrate reductase activity in the roots occurred very rapidly in the initial 4 hours upon transferring the plants to the nitrate solution. In the leaves, enzyme activity showed higher rates in the first 2 hours after nitrate addition, slowing afterwards.

After 8 hours of exposure to nitrate the activity of nitrate reductase in the roots was 34,4% higher than in the leaves. The pattern of nitrate accumulation in roots and leaves were similar, indicating efficient translocation of the element to the shoots.

The blockage of the phloem by girdling caused a rapid decline of nitrate reductase activity in the roots. Sucrose content decreased to zero 24 hours after girdling, the total and reducing sugars showing lesser variation.

The data suggested that the process of nitrate reduction in the roots is highly dependent on the continuous supply of sugars by the aerial parts, the carbohydrate reserves being insufficient to maintain adequate rates of nitrate assimilation.

In the leaves, the inhibitory effect of girdling on nitrate reductase activity was less pronounced than in the roots. Lower enzyme activity in the leaf was probably associated with decreased nitrate availability due to the inhibition of uptake by the roots.

During the early development of the plants, the initial increase of nitrate reductase activity observed in the first leaf pair coincided with maximum enzyme activity in the cotyledonary leaves. The same pattern was detected in the subsequent growth stages, where decreased activity in the first pair was accompanied by an increase of nitrate reductase activity in the second pair, and thus successively. Highest enzyme activity was consistently determined in the recently expanded leaves, which contributed to 42.7% of the total nitrate reduction of the aerial parts.

The evaluation of leaf nitrate reductase activity over the different phases of the annual cycle of mature plants indicated that higher values occurred prior to the major flowering and at the end of the period of fruit expansion (endosperm formation). These phases are associated with periods of intensive metabolite demand of the developing flowers and fruits. The removal of 50% of flowers and fruits at the time of the major flowering produced little effect on

the activity of nitrate reductase and nitrate content of leaves. On the other hand, removal of all flowers and fruits induced decreased enzyme activity and nitrate content, suggesting that these tissues represent strong sinks for metabolites and nutrients.

LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.A. e P.M. ATWILL, 1982. Nitrate reductase activity and growth response of forest species to ammonium and nitrate sources of nitrogen. *Plant and Soil*, 66:373-381.
- AFRIDI, M.M.R.K. e E.J. HEWITT, 1964. The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. I - Effects of nitrate and molybdenum on enzyme activity in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*). *J. Exptl. Bot.*, 15:251-271.
- ASHLEY, D.A.; W.A. JACKSON e R.J. VOLK, 1975. Nitrate uptake and assimilation by wheat seedlings during initial exposure to nitrate. *Plant Physiol.*, 55:1102-1106.
- ASLAM, M. e A. OAKS, 1975. Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, 56:634-639.
- ASLAM, M. e R. HUFFAKER, 1982. "In vivo" nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings in light and darkness. *Plant Physiol.*, 70:1009-1013.

- ASLAM, M. e R.C. HUFFAKER, 1984. Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. *Plant Physiol.*, 75:623-628.
- ASLAM, M.R.; R.C. HUFFAKER; D.RAINS e K.P. RAO, 1979. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiol.*, 63:1205-1209.
- ATKINS, C.A. e D.T. Canvin, 1975. Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves: effects of inhibitors. *Planta*, 123:41-51.
- BARROS, R.S.; M. MAESTRI e R.C. MOREIRA, 1982. Sources of assimilates for expanding flower buds of coffee. *Turrialba*, 32:371-377.
- BEEVERS, L., 1976. *Nitrogen metabolism in Plants*. Edward Arnold Ltda., 333p.
- BEEVERS, L. e R.H. HAGEMAN, 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20:495-522.
- BEEVERS, L.; L.E. SCHRADER; D. FLESHER e R.H. HAGEMAN, 1965. The role of light in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiol.*, 40:691-698.
- BOLLARD, E.G., 1956. Nitrogenous compounds in plant xylem sap. *Nature*, 178:1189-1190.

- BOLLARD, E.G., 1957. Nitrogenous compounds in tracheal sap of woody members of the family *Rosaceae*. *Australian J. Biol. Sci.*, 10:281-291.
- BOLLARD, E.G., 1960. Transport in the xylem. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 11:141-166.
- BREALY, O. e J.F. CARVAJAL, 1971. La actividad de la reductasa del nitrato como guía de la fertilization nitrogenada del cafeto. In: IV Simposio Latinoamericano de Fisiologia Vegetal, Lima, Peru, *Programa y Resúmenes*, , p.44-45.
- BRETELER, H. e C.H. HANISCH TEN CATE, 1980. Fate of nitrate during initial nitrate utilization by nitrogen-depleted dwarf bean. *Physiol. Plant.*, 48:292-296.
- BRETELER, H.; C.H. HANISCH TEN CATE e P. NISSEN, 1979. Time-course of nitrate uptake and nitrate reductase activity in nitrogen-depleted dwarf bean. *Physiol.Plant.*, 47:49-55.
- CANNELL, M.G.R., 1971. Production and distribution of dry matter in trees of *Coffea arabica* L. in Kenya as affected by seasonal climatic differences and the presence of fruits. *Ann. Appl. Biol.*, 67:99-120.
- CANNELL, M.G.R., 1975. Crop physiological aspects of coffee bean yield: A Review. *J. Coffee Res.*, 5:7-20.
- CANNELL, M.G.R. e P.A. HUXLEY, 1969. Seasonal differences in the pattern of assimilate movement in branches of *Coffea arabica* L. *Ann. Appl. Biol.*, 64:345-357.

- CANNELL, M.G.R. e B.S. KIMEU, 1971. Uptake and distribution of macro-nutrients in trees of *Coffea arabica* L. in Kenya as affected by seasonal climatic differences and the presence of fruits. *Ann. Appl. Biol.*, 68:213-230.
- CANVIN, D.T. e C.A. ATKINS, 1974. Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves: effect of light, carbon dioxide and oxygen. *Planta*, 116:207-224.
- CANVIN, D.T. e K.C. WOO, 1979. The regulation of nitrate reduction in spinach leaves. *Can. J. Bot.*, 57:1155-1160.
- CARELLI, M.L.C., 1979. Partição da atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merr.). Tese de Mestrado, ESALQ, USP, Piracicaba, SP, 78p.
- CARELLI, M.L.C. e A.C. MAGALHÃES, 1981. Development of nitrate reductase activity in green tissues of soybean seedlings (*Glycine max* L. Merr.). *Z. Pflanzenphysiol.*, 104:17-24.
- CARELLI, M.L.C.; J.I. FAHL e A.C. MAGALHÃES, 1984. Influência do florescimento e desenvolvimento dos frutos na atividade da redutase de nitrato em folhas de plantas de café (*Coffea arabica* L.). In: Anais do 11º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Londrina, Paraná, p.197-199.
- CARELLI, M.L.C.; J.I. FAHL e A.C. MAGALHÃES, 1985. Atividade da redutase de nitrato e taxa de fotossíntese líquida em plantas de café, em função do tempo de iluminação. In: V Congresso Anual da Sociedade de Botânica de São Paulo. Resumos, p.89.

- CARVAJAL, J.F. e J.A. CAVALLINI, 1972. Nitrate reductase activity on coffee trees as affected by mineral deficiency. American Society of Agronomy. Annual Meeting, Miami, USA, Abstract, p.190.
- CARVAJAL, J.F.; A.C. ACEVEDO e C.A. LOPES, 1969. Nutrient uptake by the coffee tree during a yearly cycle. *Turrialba*, 19:13-20.
- CATANI, R.A. e F.R.P. MORAES, 1958. A composição química do cafeeiro. *Rev. Agric.*, 33:45-52.
- CAVALLINI, J.A. e J.F. CARVAJAL, 1978. Mineral nutrition and nitrate reductase activity in coffee trees affected by mineral deficiency. *Turrialba*, 28:61-66.
- CHANTAROTWONG, W.; R.C. HUFFAKER; B.L. MILLER e R.C. GRANDSTEDT, 1976. "In vivo" nitrate reduction in relation to nitrate uptake, nitrate content, and "in vitro" nitrate reductase activity in intact barley seedlings. *Plant Physiol.*, 57: 519-522.
- CLOWES, F.A.L., 1958. Protein synthesis in root meristems. *J. Expl. Bot.*, 9:229-238.
- CORDEIRO, A.T.; A.B. RENA; L.F. MENDES; J.D. ALVES e A.A. PEREIRA, 1984. Atividade da redutase de nitrato em plantas jovens e adultas de *Coffea arabica* L., à luz e na obscuridade. In: Anais do 11º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Londrina, Paraná, p.77-79.

- CRAFTS-BRANDNER, S.J. e J.E. HARPER, 1982. Nitrate reduction by roots of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *Plant Physiol.*, 69:1298-1303.
- CULTIVARES lançados pelo IAC no período 1968-1979, 1980. *0 Agrônômico*, 32:39-168.
- DEANE-DRUMONT e D.T. CLARKSON, 1979. Effect of shoot removal and malate on the activity of nitrate reductase assayed "in vivo" in barley roots (*Hordeum vulgare* cv. Midas). *Plant Physiol.*, 64:660-662.
- EPSTEIN, E., 1972. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. New York, John Wiley and Sons. 412p.
- FAHL, J.I. e M.L.C. CARELLI, 1984. Efeitos da idade da folha e níveis de radiação sobre a taxa de fotossíntese aparente das plantas de café (*Coffea arabica* L.). Anais do 11º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Londrina, Paraná, p.200-203.
- FAIR, P.; J.TEW e C.F. CRESSWELL, 1973. Enzyme activity associated with carbon dioxide exchange in illuminated leaves of *Hordeum vulgare* L. I- Effects of light period, leaf age, and position, on carbon dioxide compensation point. *Ann. Bot.*, 37:831-844.
- FALEIROS, R.S.S.; W.J. MELO; F. CARVALHO e A.T. MIRANDA NETO, 1975. Atividade da nitrato redutase e desenvolvimento de mudas de *Coffea arabica* L. (café). *Científica*, 3:277-283.

- FERGUSON, A.R.; J.A. EISEMAN e J.H. LEONARD, 1983. Xylema sap from *Actinidia chinensis*: Seasonal changes in chemical composition. *Ann. Bot.*, 51:823-833.
- FERRARI, T.E. e J.E. VARNER, 1971. Intact tissue assay for nitrite reductase in barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, 47:790-794.
- FERRARI, T.E.; O.C. YODER e P. FILNER, 1973. Anaerobic production by plant cells and tissues: Evidence for two nitrate pools. *Plant Physiol.*, 51:423-431.
- FREDERICO, D. e M. MAESTRI, 1970. Ciclo de crescimento dos botões florais de café. *Rev. Ceres*, 17:171-181.
- FRITH, G.J.T., 1974. Light stimulated activity of nitrate reductase in apple roots. *Plant Cell Physiol.*, 15:153-155.
- GALLO, J.R. e W.L. LOTT, 1965. Método simplificado para determinação de nitrato nas folhas, com o ácido fenoldissulfônico. *Bragantia*, 24:III-VII.
- GOUVEIA, N.M., 1984. Estudo da diferenciação e crescimento de gemas florais de *Coffea arabica* L.. Observações sobre a antese e maturação dos frutos. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, 237p.

- GRAHAM, D. e E.A. CHAPMAN, 1979. Factors influencing CO₂ assimilation. Interactions between photosynthesis and respiration in higher plants. In: GIBBS, M. e L. LATZKO, eds. Photosynthesis II. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, vol. 6, Cap. IIC. Spring-Verlag, New York, p. 150-162.
- GUERRERO, M.G.; J.M. VEGA e M.LOSADA, 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann.Rev. Plant Physiol.*, 32:169-204.
- HAGEMAN, R.H. e D. FLESHER, 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.*, 35:700-708.
- HANISCH TEN CATE, C.H. e H. BRETELER, 1981. Role of sugars in nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Physiol. Plant.*, 52:129-135.
- HARPER, J.E. e R.H. HAGEMAN, 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiol.*, 49:146-154.
- HEIMER, Y.M. e P. FILNER, 1971. Regulation of nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III- The nitrate uptake system. *Biochim. Biophys. Acta*, 230:362-372.
- HEWITT, E.J., 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26:73-100.

- HEWITT, E.J.; D.P. HUCKLESBY e B.A. NOTTON, 1976. Nitrate metabolism. In: BONNER, J. e J.E. VARNER, eds. *Plant Biochemistry*. New York, Academic Press, p.633-681.
- HIPKIN, C.R.; A. AL CHARBI e K.P. ROBERTSON, 1984. Studies on nitrate reductase in British angiosperms. II. Variation in nitrate reductase activity in natural populations. *New Phytol.*, 97:641-651.
- HOAGLAND, D.R. e D.I. ARNON, 1939. The water- culture method for growing plants without soil. *Cir. Univ. of Cal. Agr. Exp. Sta.*, 347:1-39.
- JACKSON, W.A.; R.J. VOLK e T.C. TUCKER, 1972. Apparent induction of nitrate uptake in nitrate-depleted plants. *Agron. J.*, 64:518-521.
- JACKSON, W.A.; D. FLESHER e R.H. HAGEMAN, 1973. Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant Physiol.*, 51:120-127.
- KANNANGARA, C.G. e H.W. WOOLHOUSE, 1967. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Perilla frutescens*. *New Phytol.*, 66:553-561.
- KATO, T., 1980. Nitrogen assimilation by a citrus tree. 2. Assimilation of labelled ammonium and nitrate by detached leaves in light and dark. *Physiol. Plant.*, 50:304-308.
- KLEPPER, L. e R.H. HAGEMAN, 1969. The occurrence of nitrate reductase in apple leaves. *Plant Physiol.*, 44:110-114.

- KRAMER, P.J. e T.T. KOZLOWSKI, 1979. Nitrogen metabolism and nutrition. *In: Physiology of Woody Plants*, Academic Press, London, p.302-333.
- KUMAR, D. e L.L. TIESZEN, 1980. Photosynthesis in *Coffea arabica*. I- Effects of light and temperature. *Expl. Agric.*, 16:13-19.
- LEECE, D.R.; D.R. DILLEY e A.L. KENWORTH, 1972. The occurrence of nitrate reductase in leaves of *Prunus* species. *Plant Physiol.*, 49:725-728.
- LEWIS, O.A.M.; E.F. WATSON e E.J. HEWITTH, 1982. Determination of nitrate reductase activity in barley leaves and roots. *Ann. Bot.*, 49:31-37.
- LILLO, C., 1983. Diurnal variations of nitrate reductase activity and stability in barley leaves. *Physiol. Plant.*, 58:184-188.
- LILLO, C., 1984. Circadian rhythmicity in nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.*, 61:219-223.
- MAGALHÃES, A.C., 1975. Nitrate assimilation in higher plants. *What's New in Plant Physiology*, 7:1-15.
- MALAVOLTA, E.; H.P. HAAG; F.A.F. MELLO e M.O.C. BRASIL SOBRº, 1974. Nutrição mineral e adubação do cafeeiro. *In: Nutrição Mineral e Adubação de Plantas Cultivadas*. Livraria Pioneira, São Paulo, p.203-255.

- MARTIN, F.; M. CHEMARDIN e P. GADAL, 1981. Nitrate assimilation in Austrian pine. *Physiol. Plant.*, 53:105-110.
- MEGURO, N.E. e A.C. MAGALHÃES, 1982. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. *Pesq. Agropec. Bras.*, 17:1725-1731.
- MEGURO, N.E. e A.C. MAGALHÃES, 1983. Water stress affecting nitrate reduction and leaf diffusive resistance in *Coffea arabica* L. cultivars. *J. Hort. Sci.*, 58:147-152.
- NELSON, N.A., 1944. Photometric adaptation of the somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:357.
- NEYRA, C.A. e R.H. HAGEMAN, 1975. Nitrate uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots. *Plant Physiol.*, 56:692-695.
- NICHOLAS, J.C.; J.E. HARPER e R.H. HAGEMAN, 1976. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* (L) Merr.). I- Effects of light and temperature. *Plant Physiol.*, 58: 731-735.
- NUNES, M.A.; J.F. BIERHUIZEN e C. PLOEGMAN, 1968. Studies on productivity of coffee. I- Effect of light, temperature and CO₂ concentration on photosynthesis of *Coffea arabica*. *Acta Bot. Neerl.*, 17:93-102.

- NUTMAN, F.J., 1933. The root system of *Coffea arabica* L.
II - The effect of some soil condition in modifying the
normal system. *Empire Journal of Experimental Agriculture*,
1:285-296.
- OAKS, A. e B. HIREL, 1985. Nitrogen metabolism in roots.
Ann. Rev. Plant Physiol., 36:345-365.
- OAKS, A.; I. STULEN; K. JONES; M.J. WINSPEAR; S. MISRA e
I. BOESEL, 1980. Enzymes of nitrogen assimilation in
roots. *Planta*, 148:477-484.
- OLIVEIRA, L.E.M., 1985. Comportamento fisiológico de plantas
de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) sob condições de defi-
ciência hídrica: alterações da assimilação de nitrato e
mobilização de açúcares. Tese de Doutorado, UNICAMP,
Campinas, SP, 126p.
- PATE, J.S., 1973. Uptake, assimilation and transport of
nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5:109-
119.
- PATE, J.S., 1980. Transport and partitioning of nitrogenous
solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31:313-340.
- PRAKASH, S.S. e M.S. NAIK, 1982. Regulation of in vivo assay
of nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Sci.*
Lett., 25:9-14.

- QUEIROZ, C.G.S.; J.D. ALVES; A.T. CORDEIRO e A.B. RENA, 1985. Distribuição da atividade da redutase de nitrato em *Coffea arabica* L.. Anais do 12º Congresso de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, Minas Gerais, p.137-139.
- RADIN, J.W., 1977. Contribution of the root system to nitrate assimilation in whole cotton plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, 4:811-819.
- RADIN, J.W., 1978. A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves. *Plant Sci. Lett.*, 13:21-25.
- RADIN, J.W.; C.P. JORDAN, 1975. Physiological significance of "in vivo" assay for nitrate reductase in cotton seedlings. *Crop Sci.*, 15:710-713.
- RADIN, J.W.; L.L. PARKER e C.S. SELL, 1978. Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots. *Plant Physiol.*, 62:550-553.
- RAO, K.P. e D.W. RAINS, 1976. Nitrate absorption by barley. 1. Kinetics and energetics. *Plant Physiol.*, 57:55-58.
- RAVEN, J.A. e F.A. SMITH, 1980. Intracellular pH regulation in the giant-celled marine alga *Chaetomorpha darwinii*. *J. Exp. Bot.*, 31:1357-1379.
- REED, A.J.; D.T. CANVIN; J.H. SHERRARD e R.H. HAGEMAN, 1983. Assimilation of (^{15}N) nitrate and (^{15}N) nitrite in leaves of five plants species under light and dark conditions. *Plant Physiol.*, 71:291-294.

- RENA, A.B. e M. MAESTRI, 1984. Fisiologia do Cafeeiro. *In*: Simpósio sobre fatores que afetam a produtividade do cafeeiro. Poços de Caldas, vol.2, 1-87.
- RUSSO, M.T., 1983. Aspectos autoecológicos do processo de redução de nitrato em *Eichornia crassipes* (mart) solms, (Aguapé). Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, 69p.
- SAHULKA, J. e L. LISÁ, 1980. Effect of some disacharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. *Physiol. Plant.*, 50:32-36.
- SANDERSON, G.W. e E.C. COCKING, 1963. Enzimic assimilation of nitrate in tomato plants. I- Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Physiol.*, 39:416-422.
- SARRUGE, J.R., 1975. Soluções nutritivas. *Summa Phytopath.* 1:231-233.
- SASAKAWA, H. e Y. YAMAMOTO, 1978. Comparation of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. Influence of light, temperature, oxigen concentration, exogenous sucrose and metabolic inhibitors. *Plant Physiol.*, 62:665-669.
- SAWHNEY, S.K.; M.S. NAIK e D.J.D. NICHOLAS, 1978. Regulation of nitrate reduction by light, ATP, and mitochondrial respiration in wheat leaves. *Nature*, 272:647-648.
- SCHMIDT-HEBBEL, H., 1970. Determinação de carboidratos em alimentos. *In*: SCHMIDT-HEBBEL, H. Curso sobre análise química de alimentos. Apostila, Instituto Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, p.17-18.

- SCHRADER, L.E. e R.J. THOMAS, 1981. Nitrate uptake, production and transport in the whole plant. *In*: BEWLEY, J.D., ed. Nitrogen and Carbon Metabolism. Proceeding of a Symposium on the Physiology and Biochemistry of Plant Productivity, Canada, Cap.3, p.49-93.
- SHANER, D.L. e J.S. BOYER, 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I- Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.*, 58:499-504.
- SMIRNOFF, N.; P. TODD e G.R. STEWART, 1984. The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. *Ann. Bot.*, 54:363-374.
- SMIRNOFF, N. e G.R. STEWART, 1985. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. *Physiol. Plant.*, 64:133-140.
- SRIVASTAVA, H.S., 1975. Distribution of nitrate reductase in ageing bean seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 16:995-999.
- SRIVASTAVA, H.S., 1980. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry*, 19:725-733.
- STEER, B.T., 1974. Control of diurnal variations in photosynthetic products. II- Nitrate reductase activity. *Plant Physiol.*, 54:762-765.
- SUTHERLAND, J.M.; M. ANDREWS; S. McINROY e J.I. SPRENT, 1985. The distribution of nitrate assimilation between root and shoot in *Vicia faba* L.. *Ann. Bot.*, 56:259-263.

- TALEISNIK, E. e R. PACHECO, 1980. Evaluación del efecto de dosis crecientes de nitrato sobre la actividad de la reductase del Nitrato; nitrógeno derivado del fertilizante en cafeto. *Turrialba*, 30:29-34.
- TALEISNIK, E.; J.A. BRIGEÑO e J.F. CARVAJAL, 1980. Variación estacional de la reductasa de nitrato en el cafeto. *Turrialba*, 30:330-337.
- TEIXEIRA, J.P.F., 1984. Translocação de compostos nitrogenados da planta para os frutos em desenvolvimento e acúmulo de substâncias de reserva em grãos de soja (*Glycine max* L. Merr. cv. Santa Rosa). Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, 168p.
- TRAVIS, R.L. e J.L. KEY, 1971. Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase in darkgrown corn seedling. *Plant Physiol.*, 48:617-620.
- UPCROFT, J.A. e J. DONE, 1976. Circadian rhythm in nitrate reductase (NADH) activity in wheat seedlings grown in continuous light. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3:421-428.
- WALLACE, W., 1973. The distribution and characteristics of nitrate reductase and glutamate dehydrogenase in maize seedlings. *Plant Physiol.*, 52:191-196.
- WALLACE, W. e J.S. PATE, 1965. Nitrate reductase in field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. Bot.*, 29:655-671.

- WALLACE, W. e J.S. PATE, 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur (*Xanthium pennsylvanicum* wallr.). *Ann. Bot.*, 31:213-228.
- WEISSMAN, G.S., 1972. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in sunflower and soybean. *Plant Physiol.*, 49:138-141.
- WORMER, T.M. e S.G. NJUNGUNA, 1966. Bean size and shape as quality factors in Kenya Coffee. *Kenya Coffee*, 31:397-405.
- YAMAGUCHI, T. e D.J.C. FRIEND, 1979. Effect of leaf age and irradiance on photosynthesis of *Coffea arabica*. *Photosynthetica*, 13:271-278.
- YONEYAMA, T., 1981. ^{15}N studies on the "in vivo" assay of nitrate reductase in leaves: occurrence of underestimation of the activity due to dark assimilation of nitrate and nitrite. *Plant Cell Physiol.*, 22:1507-1520.
- ZIEGLER, H., 1975. Nature of transported substances. In: ZIMMERMANN, M.H. e J.A. MILBURN, eds. Transport in Plants I. Phloem Transport. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.1, Cap.II.3, Springer-Verlag, New York, p.59-94.