

NAIR EIKO MEGURO

Alterações da atividade da Redutase de Nitrato e da Resistência à Difusão do Vapor d'Água em plantas de café submetidas a condições de deficiência hídrica.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do grau de Mestre em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães

Campinas

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A Sakae e Alzira, meus pais.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. ANTONIO CELSO NOVAES DE MAGALHÃES, pela orientação na elaboração deste trabalho.
- Ao Eng^o Agr^o. ALCIDES CARVALHO, chefe da Seção de Genética do Instituto Agrônômico, pelo fornecimento do material vegetal.
- Ao Prof. Dr. HILTON SILVEIRA PINTO, pela discussão dos resultados e sugestões apresentadas.
- Aos Professores: Dr. LADASLAV SÖDEK, Dra. ROSELY FRANÇA ROCHA SHARIF e Dr. MARO RAN-IR SÖNDAHL, pelas sugestões feitas a este trabalho.
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro prestado.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.
- Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pelo apoio amigável e colaboração.

ÍNDICE

	Pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Efeito da deficiência de água nos processos fisiológicos da planta	5
2.2. Comportamento estomático em condições de deficiência hídrica	10
2.3. Efeito da deficiência hídrica sobre a atividade da Redutase de Nitrato	12
2.4. Comportamento estomático e Redutase de Nitrato em plantas de café	15
3 - MATERIAL E MÉTODO	19
3.1. Material Vegetal	19
3.2. Determinação da atividade da Redutase de Nitrato <i>in vivo</i>	23
3.3. Medida da resistência à difusão do vapor d'água nas folhas	25
3.4. Estimativa do potencial da água da folha ..	28
3.5. Avaliação do efeito da disponibilidade de água sobre a enzima Redutase de Nitrato e a Resistência à difusão do vapor d'água	29
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Padronização do método para a determinação da atividade da Redutase de Nitrato	30

	Pág.
4.1.1. Definição da idade da folha	30
4.1.2. Padrão de variação da atividade da enzima na luz e no escuro	35
4.2. Otimização das condições para a determinação da atividade enzimática	38
4.2.1. Tempo de reação e concentração de Ni- trato no meio de incubação	38
4.2.2. Efeito do pH	40
4.2.3. Efeito de diferentes tampões	42
4.2.4. Efeito da temperatura.....	44
4.2.5. Efeito de aditivos no meio de infil- tração	46
4.2.6. Efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Ni- trato	46
4.3. Efeito da disponibilidade de água para a planta sobre a atividade da enzima Reduta- se de Nitrato e a Resistência à difusão do vapor d'água na folha	50
4.3.1. Atividade da Redutase de Nitrato ...	50
4.3.1.1. Cultivar Nacional	50
4.3.1.2. Cultivar Catuai	52
4.3.1.3. Cultivar Maragogipe	54
4.3.1.4. Cultivar Mundo Novo	54
4.3.1.5. Cultivar Angustifolia	57

4.3.2. Resistência à difusão do vapor	
d'água	62
4.3.2.1. Cultivar Nacional	63
4.3.2.2. Cultivar Catuai	65
4.3.2.3. Cultivar Maragogipe	67
4.3.2.4. Cultivar Mundo Novo.....	67
4.3.2.5. Cultivar Angustifolia	70
5 - CONCLUSÕES	75
6 - RESUMO	77
7 - SUMMARY	81
8 - BIBLIOGRAFIA	84

1. INTRODUÇÃO

A produtividade vegetal pode ser equacionada como função de vários componentes, sendo a distribuição e a frequência de chuvas um dos mais importantes fatores limitantes da produção.

Os dados comparativos do balanço climático para várias regiões cafeicultoras do Brasil indicam que deficiências hídricas anuais maiores que 150 mm afetam bastante a longevidade econômica do *Coffea arabica*. São exemplos algumas áreas cafeicultoras do extremo norte do Estado de São Paulo, das partes baixas do Vale do Rio Doce e das regiões limítrofes entre Minas Gerais e norte do Espírito Santo (ORTOLANI *et al.*, 1970). Aqueles autores enfatizam também, além do total anual da seca, a importância da época da ocorrência. Em várias regiões cafeicultoras, com deficiências hídricas inferiores a 100 mm abrangendo os meses de frutificação, são observadas quebras de produtividade e

menor longevidade da planta.

A água na planta representa a integração da demanda atmosférica, potencial da água do solo, densidade e distribuição das raízes, bem como outras características da planta (KRAMER, 1969). Portanto, para se conhecer o balanço hídrico do vegetal de uma espécie, as medidas devem ser feitas na planta e não no solo ou na atmosfera.

O comportamento estomático se constitui no principal fator de controle das trocas do vapor d'água e gás carbônico nas plantas. Muitos estudos tem mostrado o aumento da resistência difusiva das folhas como resultado da diminuição progressiva do potencial da água da folha (HSIAO, 1973).

O nitrato é a principal fonte de nitrogênio para as plantas superiores crescendo em condições naturais de cultura (MAGALHÃES, 1975). O processo da redução e assimilação do nitrato resulta na síntese de aminoácidos e proteínas.

A redução do nitrato para amônia ocorre em dois estágios e envolve a participação das enzimas Redutase de Nitrato e Redutase de Nitrito. Posteriormente, a amônia é incorporada em aminoácidos, principalmente através das vias da Desidrogenase

Glutâmica (GIVAN *et al.*, 1970; MAGALHÃES *et al.*, 1974; TSUKAMOTO 1970) e Sintetase de Glutamina/Glutamina Oxolutarato Amino-transferase (MIFLIN e LEA, 1976).

A sequência metabólica da incorporação do nitrogênio mineral em compostos orgânicos é controlada pela primeira enzima envolvida, a Redutase de Nitrato (BEEVERS e HAGEMAN, 1969; HE WITT, 1975).

A Redutase de Nitrato é uma enzima citoplasmática cujo peso molecular está entre 5×10^5 e 6×10^5 , contendo na molécula Ferro, Molibdenio e FAD. As constantes de Michaelis (Km) para nitrato e para o cofator NADH são 2×10^{-4} e $2,5 \times 10^{-6}$ M, respectivamente (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

A atividade da Redutase de Nitrato varia com os diferentes fatores ambientais, tais como: luz (HAGEMAN e FLESHER , 1960; HAGEMAN *et al.*, 1961; BEEVERS *et al.*, 1965; KANNANGARA e WOOLHOUSE, 1967; LIPS e ROTH-BEJERANO, 1969; TRAVIS, HUFFAKER e KEY, 1970; TRAVIS, JORDAN e HUFFAKER, 1970; BEEVERS e HAGEMAN , 1972; STULEN *et al.*, 1973; CANVIN e ATKINS, 1974; NICHOLAS *et al.* , 1976), concentração de gás carbônico (KANNANGARA e WOOLHOUSE , 1967; CANVIN e ATKINS, 1974; PURVIS *et al.*, 1974; MAGALHÃES,

1976), temperatura (RITENOUR e HUFFAKER, 1964; MATTAS e PAULI , 1965; ONWUEME *et al.*, 1971; ALOFE *et al.*, 1973; MAGALHÃES, 1973 ; BENZIONE e HEIMER, 1977) e disponibilidade de água no solo (MATTAS e PAULI, 1965; HUFFAKER *et al.*, 1970; BARDZIK *et al.*, 1971 ; PLAUT, 1973 e 1974; MORILLA *et al.*, 1973; SHANER e BOYER, 1976), sugerindo que a enzima Redutase de Nitrato possa ser utilizada em estudos básicos relacionados com as alterações metabólicas associadas a fatores ecológicos.

O presente trabalho foi conduzido para analisar a resistência à difusão do vapor d'água e a Redutase de Nitrato como parâmetros para a avaliação do efeito da deficiência de água sobre o comportamento fisiológico de plantas de café, sob condições controladas de ambiente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Efeito da deficiência de água nos processos fisiológicos da planta.

Os processos metabólicos da planta são influenciados pelas alterações no teor de água disponível. Em geral existe uma estreita faixa de potencial hídrico, onde o efeito da falta de água induz inibição dos processos fisiológicos, principalmente nas folhas e nas raízes.

O primeiro efeito mensurável da deficiência hídrica se reflete na diminuição do processo de alongação celular (HSIAO, 1973 e 1974). A suscetibilidade na alongação celular foi demonstrada em plantas de milho, nas quais foi observado um rápido declínio na taxa de aumento do volume das células em potenciais de água abaixo de -2bars, e completa paralização em potenciais de -7 a -9bars (BOYER, 1970; HSIAO, *et al.*, 1970; ACEVEDO *et al.*, 1971). A interrupção do crescimento foi observada quando o potencial da

água foi cerca de -4bars em girassol (BOYER, 1968), -11bars em gramíneas (LUDLOW e NG, 1976) e -12bars em soja (BOYER, 1970 ; SIVAKUMAR e SHAW, 1978a). HEATHERLY *et al.* (1977) verificaram em plantas de soja, uma redução da área foliar em plantas submetidas a nove períodos de deficiência hídrica. SIVAKUMAR e SHAW (1978b) observaram que plantas de soja sob condições de campo, apresentaram uma diminuição na taxa de expansão da área foliar em resposta ao decréscimo do potencial da água do solo.

A deficiência de água também influencia o desenvolvimento das folhas através de seu efeito no primórdio foliar e subsequentes taxas de divisão celular. A taxa de emergência da folha foi diminuída ou cessou em condições de desidratação dos tecidos (HUSAIN e ASPINALL, 1970; CLOUGH e MILTHORPE, 1975), e existem evidências de seus efeitos na diminuição da divisão celular (TERRY *et al.*, 1971; KIRKHAM *et al.*, 1972; MCCREE e DAVIES, 1974).

O efeito da deficiência de água durante diferentes estágios de crescimento foi observado por SIONIT e KRAMER (1977). Plantas de soja submetidas a deficiência hídrica durante os períodos de indução à floração e de florescimento, apresentaram

menor número de flores, vagens e sementes quando comparadas com as plantas controle. Em plantas de sorgo, a taxa e o período de crescimento foram afetados pela falta de água (STOUT *et al.* 1978). No cultivar 'M35', os períodos de crescimento da folha e do caule e o desenvolvimento da inflorescência foram retardados, enquanto que no cultivar 'NK300', o período de crescimento foliar e do caule diminuiu e o desenvolvimento da inflorescência foi adiantado.

Outro processo afetado pela deficiência hídrica é a síntese de proteína. SHAH e LOOMIS (1965) observaram alterações do conteúdo de ácido ribonucleico e proteínas em plantas de beterraba sujeitas a períodos de seca. As quantidades de proteína total e solúvel por grama de matéria seca, decresceram progressivamente com a falta de água, sendo que os efeitos foram detectados antes mesmo dos sintomas de murchamento tornarem-se evidentes. BEN ZIONI, ITAI e VAADIA (1967) mostraram em discos de folhas de tabaco, a diminuição da incorporação da leucina em proteínas, em plantas previamente submetidas a falta de água. Em plântulas de milho, a deficiência hídrica causou alterações dos ribossomos da forma polimérica para a monomérica, tendo iní

cio cerca de 30 minutos após a aplicação da deficiência de água, quando o decréscimo do potencial da água pode ser medido (HSIAO, 1970). A diminuição do conteúdo de poliribossomos em tecidos de folhas em resposta à dessecação, foi observada por MORILLA *et al.* (1973), RHODES e MATSUDA (1976) e BARLOW *et al.* (1977).

Resultados de DHINDSA e CLELAND (1975) mostraram, em coleoptile de aveia, que a deficiência de água induziu alterações qualitativas no tipo de proteína produzida e uma redução quantitativa na taxa de incorporação de leucina em proteína.

A atividade de algumas enzimas, como a Redutase de Nitrato, foi diminuída com a desidratação do tecido causada pela diminuição da quantidade de água disponível (MATTAS e PAULI, 1965; HUFFAKER *et al.*, 1970; PLAUT, 1973 e 1974; SHANER e BOYER, 1976). TODD (1972) verificou, que das 25 enzimas estudadas, as mais afetadas pela falta d'água foram a Redutase de Nitrato e a Fenilalanina Amônia Liase. Observou também, que com a redução do potencial da água, a atividade de algumas enzimas como a Ribonuclease e a Amilase, tendem a aumentar no tecido.

As interações entre a fotossíntese e a falta de água foram discutidas em revisões publicadas por VAADIA *et al.* (1961)

e VAADIA e WAISEL (1967). Esses autores concluíram que, quando a radiação não é limitante, a fotossíntese decresce com a diminuição da disponibilidade de água para a planta. A fotossíntese pode ser afetada por alterações verificadas na atividade dos cloroplastos, ou devido aos efeitos sobre o comportamento estomático (BOYER e MCPHERSON, 1975; BOYER, 1976). Com a imposição da deficiência hídrica a fotossíntese diminui, como resultado do fechamento dos estômatos (TROUGHTON, 1969; BEADLE *et al.*, 1973; MEDERSKI *et al.*, 1975; BEGG e TURNER, 1976; O'TOOLE *et al.*, 1977; SILVIUS *et al.*, 1977). A limitação do suprimento de água inibe também o transporte de elétrons e a fotofosforilação em cloroplastos isolados (BOYER e BOWEN, 1970; POTTER e BOYER, 1973; KECK e BOYER, 1974) e a atividade de certas enzimas fotossintéticas (JONES, 1973; PLAUT, 1971; JOHNSON *et al.*, 1977).

Foi demonstrado por SCHNEIDER e CHILDERS (1941), UP-CHURCH *et al.*, (1955), BRIX (1962) e KAUL (1966) o aumento da respiração no início do período de interrupção do fornecimento de água para a planta, que decresceu posteriormente, quando a dessecção tornou-se mais acentuada. Vários autores verificaram que baixos potenciais da água reduziram a respiração (FLOWERS e HAN-

SON, 1969; BOYER, 1970; BELL *et al.*, 1971; MILLER *et al.*, 1971 ; KOEPPE *et al.*, 1973; LUDLOW e NG, 1976), enquanto outros autores mostraram, que a respiração não foi afetada em potenciais de crescentes da água nas células (LAWLOR e FOCK, 1978).

A deficiência hídrica acarreta diversas alterações fisiológicas na planta tais como, inibição da fotorrespiração (BOYER, 1971; LAWLOR, 1976), acúmulo de prolina (BARNETT e NAYLOR, 1966; ROUTLEY, 1966; SINGH *et al.*, 1973a e 1973b; WALDREN e TEARE, 1974; WALDREN *et al.*, 1974; HANSON *et al.*, 1977; TYMMS e GAFF, 1979) e aumento do teor de ácido abscísico (WRIGHT, 1969 e 1977; LOVEYS e KRIEDEMANN, 1973; ZABADAL, 1974; BEARDSSELL e COHEN, 1975; WALTON *et al.*, 1977).

2.2. Comportamento estomático em condições de deficiência hídrica.

Os estômatos não são afetados pelas variações da disponibilidade hídrica até um valor limite do potencial da água, a partir do qual ocorre o fechamento (HSIAO, 1973 ; BEADLE *et al.*, 1973; FRANK *et al.*, 1973; MCCREE, 1974; MILLAR e DENMEAD , 1976; WEST e GAFF, 1976; HSIAO e ACEVEDO, 1974; BEGG e TURNER ,

1976; CUTLER e RAINS, 1977; KLAR *et al.*, 1978; CARLSON *et al.*, 1979). Entretanto, o valor limite do potencial da água para o fechamento dos estômatos varia entre as espécies de plantas e a posição da folha na copa (TURNER, 1974; MCCREE, 1974; MILLAR e DENMEAD, 1976; BEADLE *et al.*, 1978), estágio de desenvolvimento (FRANK *et al.*, 1973), números de períodos de falta de água (BROWN *et al.*, 1976; CUTLER e RAINS, 1977), grau de ajustamento do potencial osmótico (BEADLE *et al.*, 1978; TURNER *et al.*, 1978) ou ainda se as plantas foram crescidas em ambiente controlado ou no campo (JORDAN e RITCHIE, 1971; MCCREE, 1974; LUDLOW e NG, 1976; DAVIES, 1977). Foram observados também, diferenças quanto a regulação estomática à perda d'água durante as fases de crescimento vegetativo e reprodutivo em plantas de sorgo e milho (ACKERSON e KRIEG, 1977).

O mecanismo para o fechamento dos estômatos, induzido pela falta de água, está relacionado com a perda de solutos das células guarda, principalmente potássio. Como resultado, a diferença da turgescência entre as células guarda e as células subsidiárias decresce, ocasionando o fechamento dos estômatos (EHRET e BOYER, 1979).

BLUM (1974) mostrou diferença na ação estomática, em 14 genótipos de sorgo cultivados em condições de campo, submetidos a deficiências crescentes em água no solo. HENZELL *et al.* (1975) encontraram, em 23 genótipos de sorgo, uma acentuada variação na suscetibilidade dos estômatos a falta de água no solo. A condutância estomática das folhas dos cultivares 'Alpha' e 'Shallu', decresceu rapidamente com a diminuição do potencial da água ao passo que, em 'I.S. 1598' e 'M35-1' o declínio desta condutância ocorreu mais lentamente (HENZELL *et al.*, 1976).

ROARK e QUISENBERRY (1977) observaram em duas linhagens de algodão, a existência de um componente ambiental e genético da resistência difusiva. A alta resistência foliar foi completamente dominante em relação à baixa resistência. KLAR *et al.* (1978) observaram em populações de capim colonião, diferenças significativas do comportamento estomático em plantas submetidas a ausência de água.

2.3. Efeito da deficiência hídrica sobre a atividade da Redutase de Nitrato.

A enzima Redutase de Nitrato é sensível às variações do teor de água na planta e é inibida quando o potencial

da planta diminui abaixo de um determinado limite. HUFFAKER *et al.*(1970) correlacionaram a atividade da Redutase de Nitrato com o potencial da água da folha e observaram que os dois parâmetros foram diretamente relacionados, sugerindo que a Redutase de Nitrato pode ser um indicador do estado de energia da água no tecido. Os mesmos autores concluíram que a Redutase de Nitrato foi mais sensível à deficiência hídrica que outras enzimas como a Redutase de Nitrito, Fosforibuloquinase, Fosfoenol Piruvato Carboxilase e Ribulose 1,5 Difosfato Carboxilase. HEUER *et al.*(1979) verificaram que a Redutase de Nitrato, foi mais sensível que a Redutase de Nitrito aos diferentes tratamentos de deficiência hídrica.

PLAUT (1974) observou em plântulas de trigo, uma queda da atividade enzimática associada com a diminuição do conteúdo relativo de água nas folhas, e mostrou também, a recuperação da atividade da Redutase de Nitrato depois da remoção da limitação hídrica.

A variação diária do conteúdo relativo de água e da atividade da Redutase de Nitrato, foram observadas em plantas de trigo, sob condições ótimas de disponibilidade de água e au-

sência da mesma. A atividade da Redutase de Nitrato foi menor em plantas submetidas à deficiência hídrica, comparadas com as plantas sob condições ótimas e, em ambos os tratamentos, a enzima apresentou um comportamento rítmico (RAJAGOPAL *et al.*, 1972).

Em plantas de soja, comparando-se o efeito de diferentes níveis de disponibilidade de água sobre a atividade da Redutase de Nitrato e a resistência estomática, foi observado que a atividade enzimática decresceu quando o potencial da água atingiu valores abaixo de -8bars, ocorrendo o fechamento dos estômatos em valores de potencial inferiores a -16bars (RADHAMOHANRAO *et al.*, 1977).

A atividade da Redutase de Nitrato em plantas de algodão, foi dependente do nível de deficiência hídrica (ACKERSON *et al.*, 1977).

Nos cultivares de arroz com diferentes graus de resistência à seca, a Redutase de Nitrato apresentou atividade variável com a diminuição da quantidade de água disponível as plantas. A atividade enzimática do cultivar resistente, 'TKM-1', decresceu lentamente, enquanto que, do cultivar 'IS' o declínio ocorreu rapidamente (MALI e MEHTA, 1977).

Em plântulas de milho ou trigo, o acúmulo de nitrato foi relacionado com a diminuição da atividade da Redutase de Nitrato em condições de deficiência hídrica (MATTAS e PAULI, 1965; MARANVILLE e PAULSEN, 1972).

O decréscimo da atividade da Redutase de Nitrato que ocorre em condições de falta d'água, parece associado a um desequilíbrio entre as taxas de síntese e degradação da enzima (BARZIK, 1971). MORILLA *et al.* (1973) concluíram que a inibição da atividade, foi devido à diminuição da síntese da enzima. SHANER e BOYER (1976) observaram que a atividade da Redutase de Nitrato em condições de falta de água, foi controlada pelo fluxo de nitrato que, por sua vez, regula a taxa de síntese da enzima.

2.4. Comportamento estomático e Redutase de Nitrato em plantas de café.

A quantidade de água transpirada pelo cafeeiro (*Coffea arabica* L), de acordo com os resultados de NUTMANN (1941), é de $20,7 \text{ mg/dm}^2/\text{min}$, um valor muito próximo ao encontrado por FRANCO e INFORZATO (1950) que foi de $17,6 \text{ mg/dm}^2/\text{min}$. A quantidade de água transpirada pelo cafeeiro foi de $6,29 \text{ g/dm}^2/\text{dia}$

(FRANCO e INFORZATO, 1950). Este valor entretanto, é grandemente variável com as condições ambientais e sazonais.

Em Tanzania, NUTMAN (1937) observou que os estômatos de café durante os dias encobertos ou sob sombra, permaneciam abertos o dia todo, e em dias de pleno sol existia um fechamento parcial. Resultados semelhantes também foram obtidos por FRANCO (1938) em São Paulo, ALVIM e HAVIS (1954) em Turrialba.

MAESTRI e VIEIRA (1958) observaram no cultivar Bourbon, que durante os períodos secos, os estômatos permaneceram fechados durante o dia todo, com exceção de um curto período pela manhã, quando foram observados estômatos semi-abertos; este comportamento foi atribuído à deficiência de água nas folhas.

VIEIRA DA SILVA *et al.* (1960) verificaram que a transpiração, medida pelo método do papel de cloreto de cobalto, foi inversamente proporcional a hidratação das folhas, avaliada pela turgescência relativa.

BRAVO e FERNANDEZ (1964) observaram máxima abertura dos estômatos quando a umidade do solo foi acima de 70% de água disponível. Com o declínio do teor de água no solo, ocorreu a diminuição da abertura estomática.

Usando a técnica de infiltração foliar com a mistura de isopropanol e água, WORMER (1965) encontrou uma alta correlação entre a quantidade de água no solo e a abertura estomática.

O comportamento estomático de 8 seleções de café, durante um ciclo de deficiência hídrica, foi estudado por NUNES e DUARTE (1969) e NUNES (1970 e 1974). O fechamento estomático constituiu o primeiro sinal indicativo de falta d'água no solo, detectável antes que 50% de água disponível fosse consumida.

TESHA e KUMAR (1978) observaram em plantas de café, que a taxa da transpiração foi reduzida com a falta de água. Esses autores verificaram também, que as plantas que receberam nitrogênio com adequado suprimento de água, apresentaram maior taxa de transpiração comparadas àquelas que não receberam o nitrogênio adicional. Com a ausência de água, as plantas com suprimento adicional de nitrogênio apresentaram menor taxa de transpiração.

BREALY e CARVAJAL (1971) verificaram em folhas de café, um aumento da atividade da enzima Redutase de Nitrato com a crescente disponibilidade de nitrogênio para a planta.

O efeito da deficiência mineral sobre a atividade da

Redutase de Nitrato no cultivar Bourbon, foi estudado por CAVALLINI e CARVAJAL (1972) e CARVAJAL e CAVALLINI (1978). A menor atividade da Redutase de Nitrato em relação ao controle, em plantas deficientes em nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, magnésio ou enxofre foi associada ao bloqueio da síntese da enzima , causado pela influência direta ou indireta destes elementos.

FALEIROS *et al.* (1975) observaram em mudas de Mundo Novo cultivadas a meia sombra, maior atividade da Redutase de Nitrato que as cultivadas a pleno sol. A adubação nítrica determinou maior atividade da Redutase de Nitrato que a forma amoniacal, tanto a pleno sol quanto a meia sombra.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Material Vegetal

As plantas de café (*Coffea arabica* L.) abaixo mencionadas, foram obtidas na Seção de Genética do Instituto Agronômico, Campinas, S.Paulo. Os diversos materiais vegetais estudados foram escolhidos em função do prévio conhecimento de suas diferenças quanto ao crescimento e produção.

Os cultivares utilizados foram os seguintes:

'Nacional' - cafeeiros derivados de *Coffea arabica* L. *arabica*, se caracteriza por apresentar porte médio, 2 a 3 metros de altura, ramos laterais primários levemente pendentes, ramos secundários e terciários não muito abundantes. As folhas novas no geral são bronzeadas e as folhas desenvolvidas são levemente coriáceas, com lâmina e margem pouco onduladas, ângulo de base pequeno e domácias de tamanho médio .

As flores apresentam corola branca, são biloculares ou, às vezes triloculares, cálice rudimentar denticulado. Os frutos são oval elípticos, lisos, brilhantes, mesocarpo carnosos, endocarpo fibroso (pergaminho). Sementes plano convexos, de coloração esverdeada. Por ser a variedade mais antiga no Brasil, foi considerada em Campinas como tipo padrão nos estudos de taxonomia e genética (KRUG *et al.*, 1939).

'Angustifolia'- caracterizada por possuir folhas acentuadamente estreitas e afiladas em ambas extremidades. As nervuras às vezes são bem salientes e as domâcias menos numerosas e menores do que da variedade *arabica*. Algumas plantas se apresentam com porte semelhante ao desta variedade e são unicaules; outras atingem altura menor e são multicaules. No geral, o vigor vegetativo de Angustifolia é reduzido e a produção é escassa. As flores e sementes são semelhantes aos da variedade *arabica* (KRUG *et al.*, 1955). Vários fatores genéticos

são responsáveis para o fenótipo *Angustifolia* (KRUG, 1949; KRUG *et al.*, 1955).

'Maragogipe' - mutação dominante da variedade *arabica* (KRUG e CARVALHO, 1942), ocorrida no Estado da Bahia. Plantas mais altas e vigorosas que *arabica*, internódios longos e folhas, flores e frutos maiores que na variedade *arabica* (KRUG *et al.*, 1973). Produzem pouco, pois a ramificação primária e secundária é mais reduzida e o número de flores por axila foliar é muito inferior ao *arabica* (CARVALHO, 1939).

'Mundo Novo' - cultivar brasileiro resultante de um cruzamento natural entre 'Bourbon' x 'Sumatra' (CARVALHO *et al.*, 1952). São mais produtivas, de maior vigor vegetativo, de maior porte, avaliado pela altura e diâmetro; com sementes de maior peso e maior diâmetro, quando comparadas às progênes dos cultivares de Tipica, Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho, Caturra Amarelo, Caturra Vermelho e Sumatra (CARVALHO *et al.*, 1961 e 1964; MONACO

et al., 1965).

'Catuai' - obtido na Seção de Genética do Instituto Agrônomico de Campinas a partir da hibridação entre o Caturra e o Mundo Novo, vem-se mostrando de interesse econômico para as regiões cafeeiras não somente pelo porte pequeno, mas também pela produtividade, pelo vigor vegetativo e pela precocidade (CARVALHO e MONACO, 1972).

As plantas, com cerca de um ano de idade, foram transplantadas para vasos plásticos contendo aproximadamente 3 kg de solo do tipo terra-roxa misturada e mantidos em casa de vegetação.

Vinte e quatro horas antes do início de cada experimento, oito plantas de cada variedade foram transferidas da casa da vegetação para a câmara de crescimento com ambiente controlado, regulado para a temperatura de 28°C durante o dia e 20°C à noite e 12 horas de fotoperíodo.

A câmara de crescimento utilizada, marca 'Convicon', modelo EF-7, de 0,7 m² de área útil, possui controle de temperatura por termostato e condensador refrigerado a ar, com compres

sor de desvio contínuo de gás quente e remoção do ar do sistema realizado por meio de filtros com circulação vertical. A iluminação foi fornecida por meio de 8 lâmpadas fluorescentes VHO de 80 watts cada uma e quatro incandescentes de 25 watts permitindo uma iluminância nominal equivalente a 18000 lux, a uma distância de aproximadamente 30 cm. A radiação total obtida foi de $0,22 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$.

3.2. Determinação da atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*

A atividade da enzima Redutase de Nitrato *in vivo* foi determinada pelo método descrito por KLEPPER *et al.* (1971) e modificado por HARPER e HAGEMAN (1972).

As folhas foram cortadas com um furador de rolhas manual, em discos de aproximadamente 10 mm de diâmetro. O tecido foi pesado (0,2 g) e em seguida, transferido para frascos de vidro contendo 5 ml de solução denominada de meio de incubação, constituída por 0,1 M de fosfato de potássio, pH 7,5, 0,2 M de nitrato de potássio. Em cada frasco foi colocado um suporte destinado a manter o tecido imerso no meio de incubação. As amostras de tecido foram colocadas num dessecador à vácuo, por 2 mi

nutos. O ar foi rapidamente reintroduzido e o procedimento repetido. Os discos de folhas foram em seguida, transferidos para um banho-maria agitador e incubados por 1 hora a 30°C no escuro. Dentro de um intervalo de tempo variável entre 15 minutos e 1 hora, alíquotas de 0,2 ml foram retiradas para a determinação da concentração do nitrito formado pela reação. Em cada alíquota foram adicionados 2 ml de reagente constituído por N-2-naftil etileno diamino di HCl 0,02 % e sulfanilamida 1 % em HCl 1,5 N(v/v). As absorbâncias foram determinadas a 540 nm, em espectrofotômetro. A atividade da Redutase de Nitrato foi expressa em μ moles de nitrito formado por grama de peso fresco por hora ou, em μ moles de nitrito formado por grama de peso seco por hora, conforme o experimento.

As condições para a determinação da atividade enzimática foram padronizadas para tecidos de folhas de café, visando otimizar a técnica quanto à concentração de nitrato e de propanol no meio de incubação, tempo decorrido para a retirada de alíquotas e temperatura de incubação. Foram verificados também, o efeito do pH, tipo de tampão e tempo de exposição à luz previamente à retirada das amostras. Todas as determinações foram feitas com

três repetições para cada tratamento.

3.3. Medida da resistência à difusão do vapor d'água nas folhas.

Os valores da resistência à difusão do vapor d'água nas folhas foram calculados pela fórmula de GAASTRA (1959), a partir de medidas simultâneas da taxa de transpiração, temperatura da folha e do ar circundante, e concentração do vapor d'água da atmosfera da câmara de crescimento.

A equação empregada foi:

$$T = \frac{C_f - C_a}{R}$$

onde:

T = taxa da transpiração, em $\text{gH}_2\text{Ocm}^{-2}\text{s}^{-1}$

C_f = concentração do vapor d'água da atmosfera interna da folha em $\text{gH}_2\text{Ocm}^{-3}$

C_a = concentração do vapor d'água do ar ambiente adjacente à folha, em $\text{gH}_2\text{Ocm}^{-3}$

R = resistência à difusão do vapor d'água, em scm^{-1}

A transpiração foi determinada pelo método de pesagens de vasos (FRANCO e MAGALHÃES, 1965). Imediatamente antes da pesa

gem inicial do conjunto vaso-solo-planta, os vasos de plástico contendo as plantas foram envolvidos com sacos de polietileno a fim de evitar a evaporação pela superfície exposta do solo e, assim, assegurar que toda perda de peso foi devida somente a transpiração. A primeira pesagem foi feita decorridos 4 a 5 horas de iluminação e a segunda pesagem foi feita 6 horas após a primeira. Após a determinação da transpiração, a área foliar foi estimada a partir de pesagem dos recortes das projeções dos perímetros foliares em papel sulfite, comparando-se com o peso de uma área conhecida do mesmo papel. Os cálculos da concentração do vapor d'água (Cf) foram feitos a partir dos valores de umidade relativa e temperatura, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Cf = \frac{288 \times es}{273 + t}$$

onde:

Cf = concentração do vapor d'água da atmosfera interna da folha em gH_2Ocm^{-3}

es = tensão de saturação de vapores à temperatura do ar (valor tabelado)

t = temperatura foliar, em °C.

Em experimentos preliminares, a temperatura foliar foi medida na superfície inferior da folha, utilizando-se termopar e, concomitantemente, foi registrada a temperatura da câmara de crescimento. Foi verificado que as diferenças entre os valores não foram significativas e, portanto, nos experimentos posteriores foi considerada apenas a temperatura da câmara. A concentração do vapor d'água do ar ambiente adjacente à folha (C_a) foi determinada pela expressão:

$$C_a = \frac{288 \times e_a}{273 + t}$$

$$e_a = \frac{UR \times e_s}{100}$$

onde:

C_a = concentração do vapor d'água do ar ambiente adjacente à folha, em $\text{gH}_2\text{Ocm}^{-3}$

e_a = tensão atual de vapor, em mmHg

t = temperatura do ar em $^{\circ}\text{C}$

e_s = tensão de saturação de vapores à temperatura do ar

UR = umidade relativa

As medidas da umidade relativa foram feitas utilizando-se um termohigrômetro, marca Airguide (Airguide Instrument

Company), previamente calibrado para a faixa de estudo.

3.4. Estimativa do potencial da água da folha

Diferentes potenciais da água da folha foram induzidos pela interrupção da irrigação das plantas por vários períodos de tempo, e suas variações acompanhados através de determinações do potencial da água do xilema (Ψ). A avaliação do potencial do xilema foi feita pela bomba de pressão de Scholander PMS mod. 1000 (PMS Instrument Company).

A folha destacada foi imediatamente colocada na câmara de pressão de maneira que o pecíolo ficasse fixo na tampa e o sistema vascular pudesse ser observado com o auxílio de uma lente de aumento. A saída do gás nitrogênio através da tampa foi impedida, envolvendo o pecíolo com um segmento de borracha. Foram aplicadas pressões crescentes na folha, anotando-se a pressão correspondente aos primeiros sinais de molhamento da secção do pecíolo devido a saída dos conteúdos do xilema. Esta pressão, com sinal negativo, é equivalente à tensão existente no xilema, antes da retirada da folha. Os valores do potencial do xilema, em folhas de café dá a estimativa do potencial da água da folha, como mostrado por ANGELOCCI e MAGALHÃES (1977).

3.5. Avaliação do efeito da disponibilidade de água sobre a enzima Redutase de Nitrato e a Resistência à difusão do vapor d'água.

Com a interrupção da irrigação das plantas foram obtidos os diferentes valores de potenciais da água da folha. A mesma folha destinada a determinação da atividade da Redutase de Nitrato foi usada para a medida do potencial da água. A folha após destacada para a avaliação do potencial da água, foi transferida para um recipiente com gelo e no laboratório utilizada para as determinações da atividade enzimática. Diferentes lotes de plantas foram utilizados para a determinação dos valores da resistência à difusão do vapor d'água. Na maioria dos casos, os experimentos foram repetidos duas ou três vezes com o objetivo de assegurar a reprodutibilidade dos resultados. Os valores obtidos foram representados graficamente e foram feitas as análises de regressão. O teste t foi aplicado para as comparações dos coeficientes de regressão das variedades estudadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronização do método para a determinação da atividade da Redutase de Nitrato

4.1.1. Definição da idade da folha

O efeito da idade fisiológica do tecido na atividade da Redutase de Nitrato já foi demonstrado em diferentes espécies de plantas (HARPER e HAGEMAN, 1972; BILAL e RAINS, 1973; SRIVASTAVA, 1975). Assim, a fim de padronizar o ensaio da enzima Redutase de Nitrato em folhas de café, foi necessário, inicialmente, determinar a atividade enzimática em diferentes fases do desenvolvimento da folha. Cinco pares de folhas de diferentes plantas foram marcados no estágio correspondente as folhas jovens, de aspecto brilhante, tonalidade verde clara ou bronzeada, com área foliar de aproximadamente $2,5 \text{ cm}^2$. Este estágio foi considerado como a fase inicial de expansão foliar (dia zero). A partir do início dos experimentos considerando as folhas

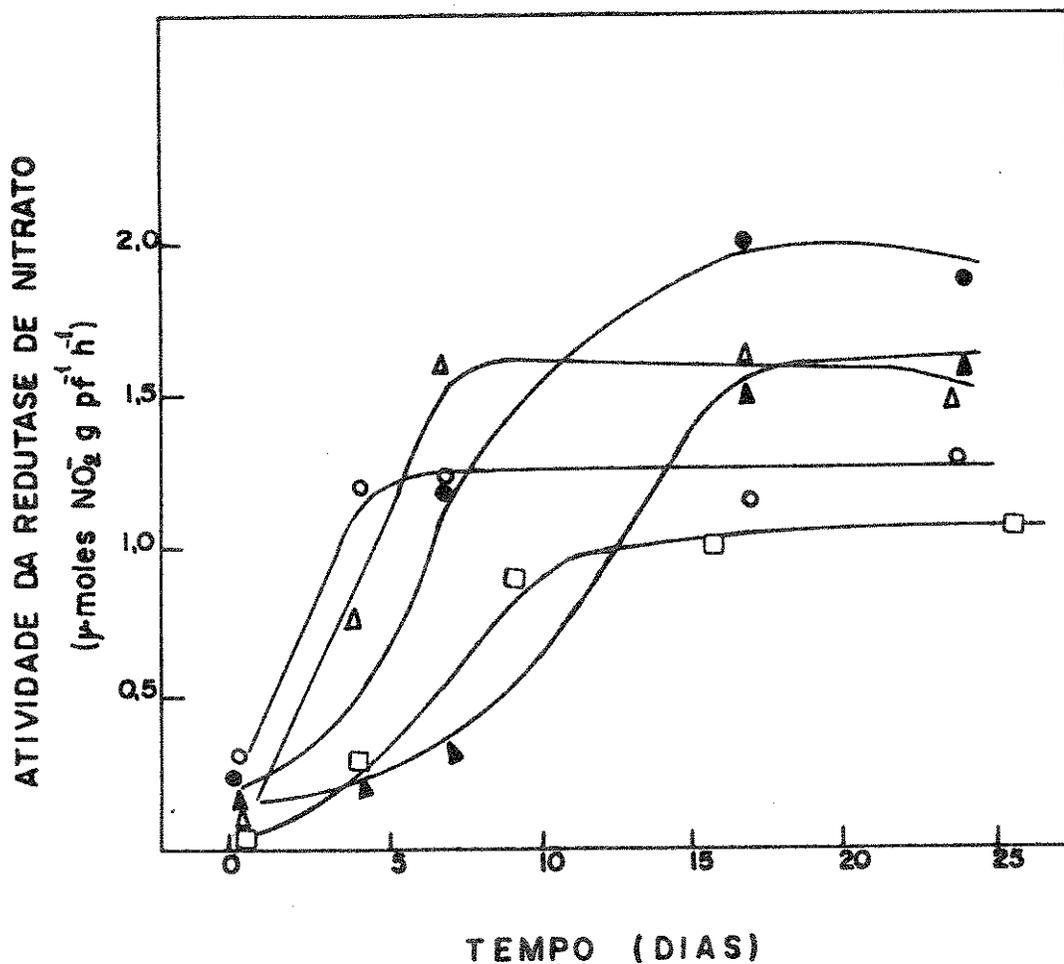


Fig. 1 - Efeito da idade do tecido foliar sobre a atividade da Redutase de Nitrato. Média de 5 repetições.

- | | | | |
|-----|--------------|-----|------------|
| (▲) | Angustifolia | (□) | Catuai |
| (●) | Maragogipe | (○) | Mundo Novo |
| (△) | Nacional | | |

mais jovens, outras folhas de diferentes idades foram retiradas para a determinação da atividade enzimática.

Os resultados expressos na figura 1 mostram padrões de atividade em relação a idade da folha em todas as variedades, sendo que nas folhas mais jovens, dia zero, as atividades foram sistematicamente mais baixas. Com o aumento da idade da folha, a atividade enzimática cresceu até um determinado valor, a partir do qual permaneceu constante. Foram detectadas diferenças intervarietais com referência ao padrão de atividade enzimática durante o desenvolvimento foliar.

Em outro experimento, tecidos foliares de idades fisiológicas diversas, foram obtidos pela retirada de folhas localizadas em diferentes posições em um único ramo plagiotrópico, de plantas do cultivar Mundo Novo. Os pares foliares, em número de cinco, foram enumerados a partir do ápice sendo que o 1º par continha folhas ainda não totalmente expandidas. O 2º par correspondeu às folhas com 25 dias, como no experimento anterior. Nos 3º e 4º pares as folhas se encontravam em estágio de maturidade fisiológica, e o 5º par com folhas em início de senescência. Os resultados sumariados na figura 2, mostram atividades

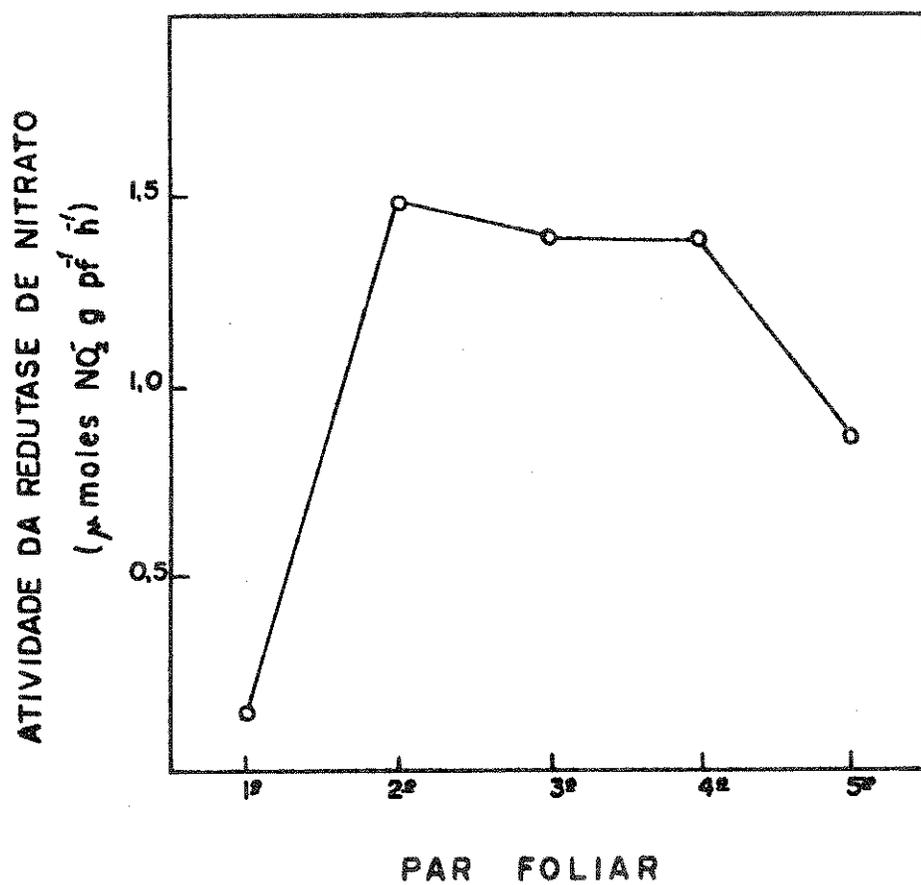


Fig. 2 - Influência da idade fisiológica da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, cultivar Mundo Novo. O tecido foi obtido de folhas de diferentes pares localizados em um ramo plagiotrópico, a partir do ápice. Média de três repetições.

enzimáticas mais baixas nos 1º e 5º pares e mais elevadas nos tecidos de folhas dos 2º, 3º e 4º pares de folhas. As variações na atividade da Redutase de Nitrato observadas nos pares foliares de diferentes idades podem ser resultantes das diferenças na capacidade dos tecidos de síntese de proteína e fixação do CO_2 . KANNANGARA e WOOLHOUSE (1967) mostraram que em folhas de *Perilla*, a capacidade para a síntese da Redutase de Nitrato foi maior em folhas mais jovens e menor em folhas maduras e senescentes. Estes autores sugeriram ainda que a síntese da enzima parece ser dependente da atividade fotossintética. WALLACE e PATE (1965) verificaram que a quantidade de proteína existente no tecido vegetal pode ser correlacionada com sua capacidade para a síntese de Redutase de Nitrato. JORDAN e HUFFAKER (1972) demonstraram que a quantidade da Redutase de Nitrato presentes em secções de folhas de cevada de diferentes idades fisiológicas, está relacionada com a quantidade de polirribossomos presentes. Aqueles autores sugeriram que os produtos da fotossíntese são necessários para a indução da atividade da Redutase de Nitrato. Considerando-se que tecidos fisiologicamente ativos, com suficiente habilidade para a fixação do CO_2 e síntese de proteína,

apresentam maior atividade da Redutase de Nitrato, decidiu - se que o 3º par de folhas seria preferencialmente utilizado para os estudos posteriores.

4.1.2. Padrão de variação da atividade da enzima na luz e no es curo.

Todos os ensaios da enzima Redutase de Nitrato foram conduzidos com plantas mantidas em condições de temperatura e re
gime de luminosidade constantes durante os períodos de ilumina -
ção e obscuridade. Devido a artificialidade das condições, foi julgado necessário um estudo do andamento da atividade enzimática durante os períodos de luz e escuro. Foi convencionado como zero hora de luz a amostragem feita imediatamente antes das lu -
zes se acenderem. A figura 3 apresenta os resultados obtidos para o cultivar Mundo Novo. Nota-se um aumento na atividade da enzima logo após o início do período de iluminação. Esta intensifi -
cação da atividade da Redutase de Nitrato, em resposta à radia -
ção luminosa, pode ter sido causada pelo aumento do fluxo de ni -
trato através do xilema em direção às folhas, que decorre da transpiração (SHANER e BOYER, 1976). Por outro lado, sabe-se

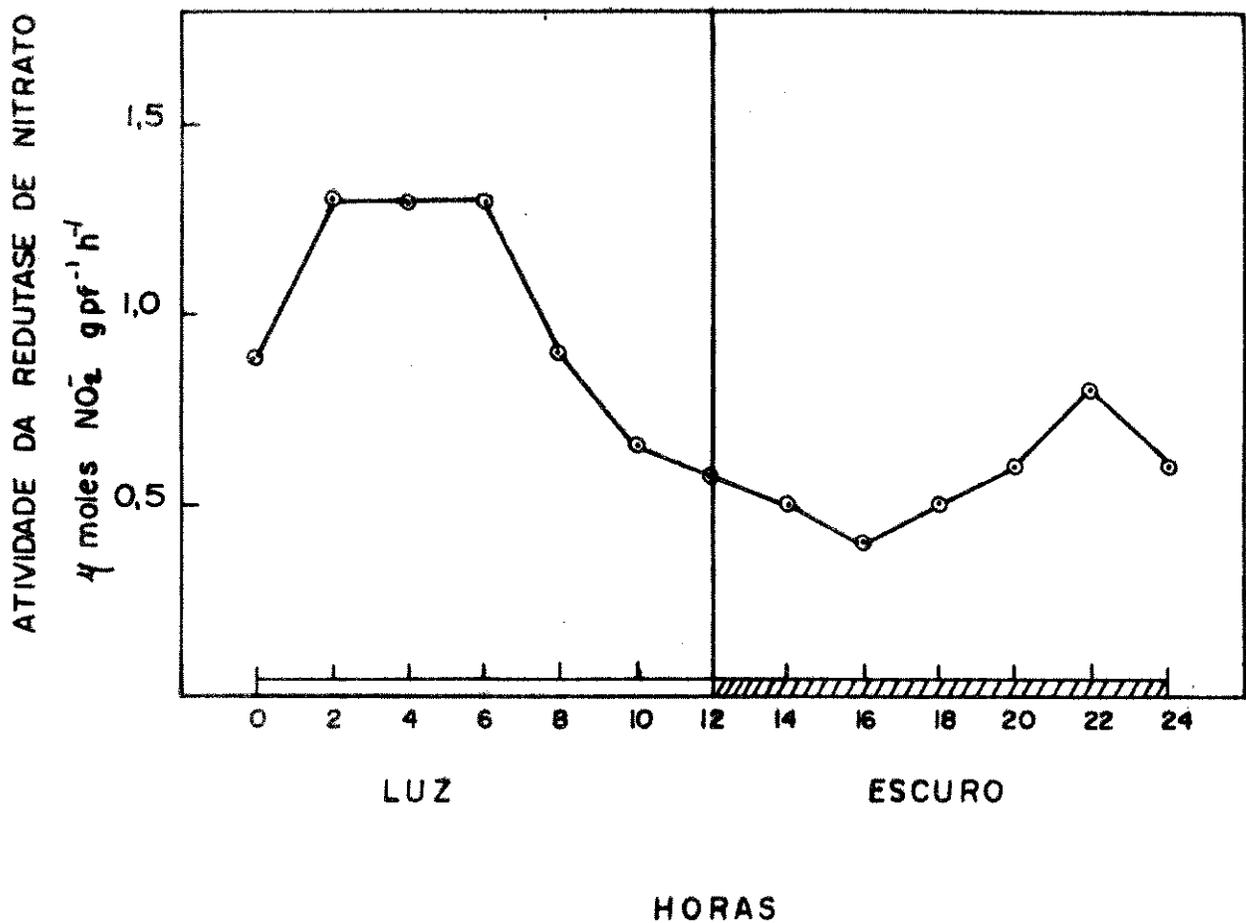


Fig. 3 - Atividade da enzima Redutase de Nitrato *in vivo* em folhas de café do cultivar Mundo Novo durante o período de luz e escuro em ambiente controlado. Média de três repetições.

que a redução do nitrato está associada com o processo da oxidação dos carboidratos produzidos na fotossíntese e relacionada com a disponibilidade de NADH no citoplasma (KLEPPER *et al.* 1971).

Após 6 horas de iluminação observa-se uma queda na atividade enzimática, possivelmente devido a inibição da Redutase de Nitrato causada pelo acúmulo de compostos intermediários do metabolismo do nitrogênio. (BILAL e RAINS, 1973). O acúmulo de aminoácidos produzidos por um processo muito intenso de assimilação poderá provocar retroinibição na atividade da Redutase de Nitrato (FILNER, 1966; STEWART, 1972; HEIMER e RIKLIS, 1979). No escuro, com a diminuição da taxa de redução de nitrato, a inibição poderia ser liberada em parte, causando um aumento temporário da atividade enzimática após um período de obscuridade. A energia necessária para o processo de redução no escuro estaria relacionada com a degradação dos produtos fotossintéticos armazenados e o conseqüente aumento da disponibilidade de NADH para a reação catalizada pela Redutase de Nitrato (ASLAM *et al.*, 1979). Em função dos resultados obtidos neste experimento, as amostragens subsequentes foram sistematicamente feitas

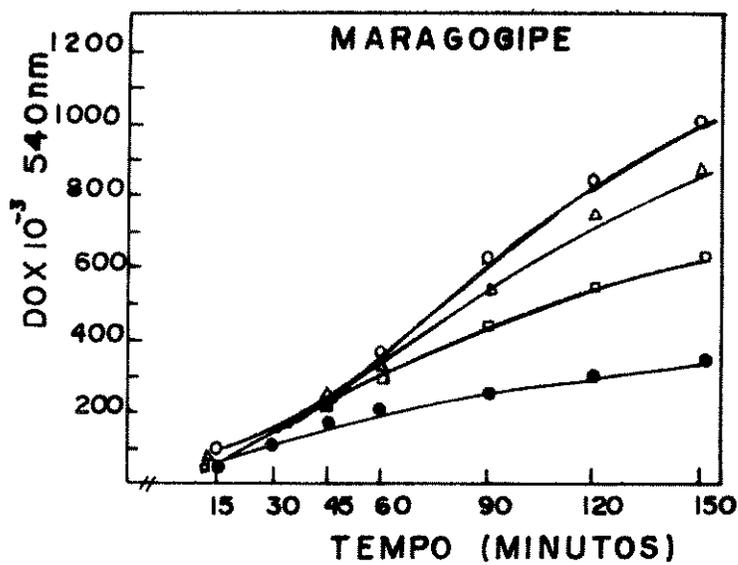
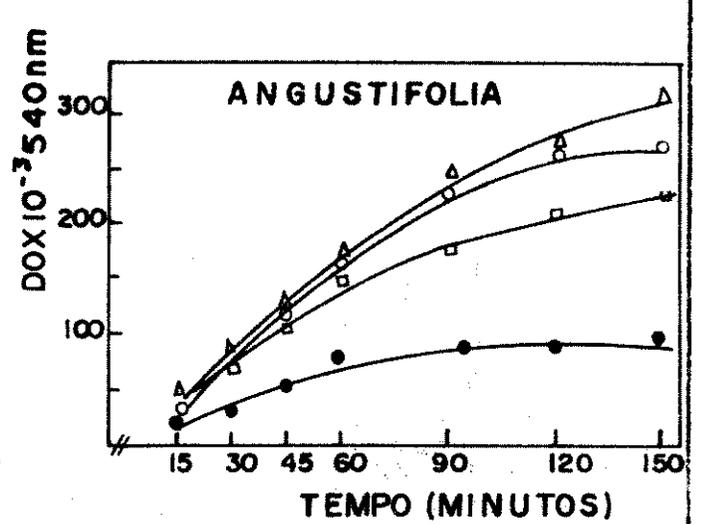
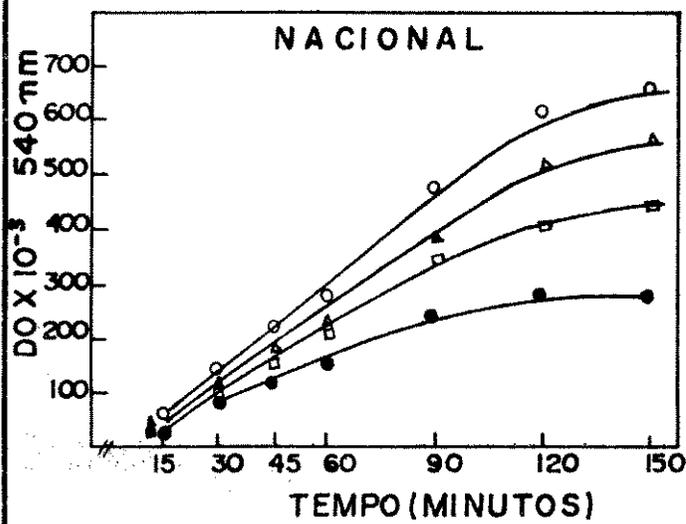
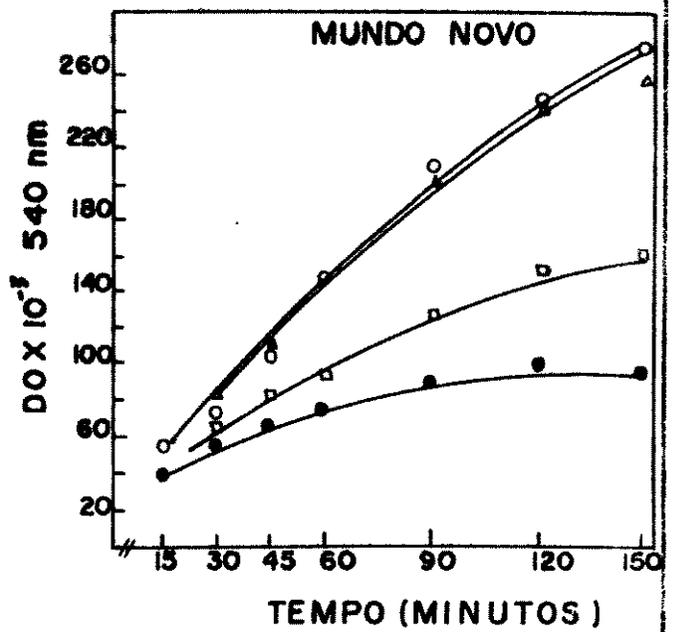
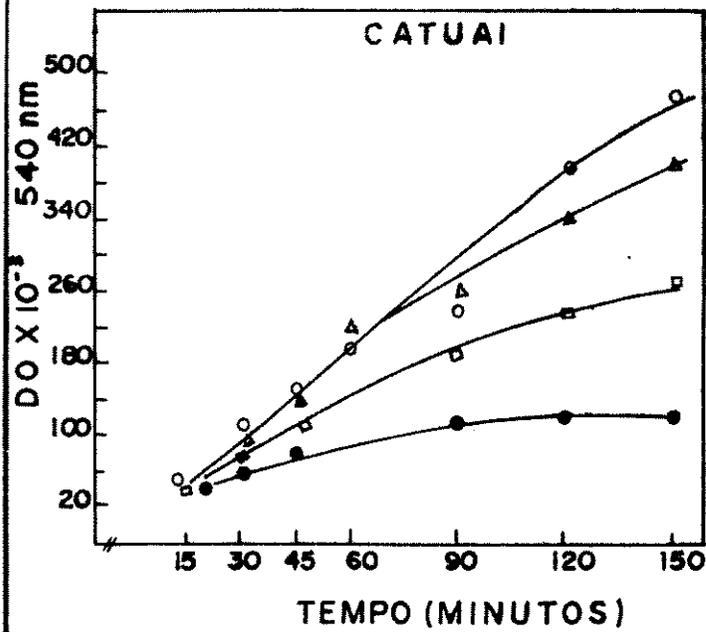
hh

dos 4 a 5 horas de iluminação, quando a enzima atingiu o máximo de atividade.

4.2. Otimização das condições para a determinação da atividade enzimática

4.2.1. Tempo de reação e concentração de nitrato no meio de incubação.

Em folhas de café, a quantidade de nitrato reduzido foi relacionada com a concentração de nitrato presente no meio de incubação e também, com o tempo de reação. A quantidade de nitrato mais adequada para possibilitar atividade máxima da enzima Redutase de Nitrato foi determinada pela adição de nitrato de potássio ao tampão fosfato (0,1M, pH. 7,5), em concentrações de 0,05M, 0,1M, 0,2M e 0,4M. Alíquotas de 0,2ml, foram retiradas em períodos de tempo de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após o início da reação. Pela figura 4 nota-se que existe uma relação linear entre a taxa de liberação dos íons nitrito no meio de incubação, resultante da reação do nitrato, e o tempo de reação compreendido entre 15 a 90 ou 120 minutos, em concentrações de 0,05M e 0,1M, dependendo do cultivar considerado



para estudo. Para as concentrações de 0,2M e 0,4M não foi observada uma linearidade na velocidade de reação, e a taxa de redução do nitrato foi mais baixa provavelmente devido a inibição provocada pelo aumento da concentração salina no meio de reação. Em função dos resultados experimentais e objetivando a padronização das determinações, ficou estabelecida a utilização da concentração de 0,1M de nitrato no meio de incubação e a retirada de alíquotas 15 a 75 minutos após o início da reação, faixa em que ocorre a linearidade da reação.

4.2.2. Efeito do pH

A influência do pH do meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato foi estudada objetivando estabelecer condições ótimas para o ensaio enzimático. Baseada em experimentos preliminares, a faixa de pH escolhida para estudo foi de 6 a 9. O tampão fosfato foi preparado com K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 , 0,1M, e os pH acertados com HCl 1N. A concentração de nitrato foi a de 0,1M e a temperatura do banho-maria foi de 30°C. Os valores expressos na figura 5 demonstram que, em todos os cultivos, a atividade da Redutase de Nitrato foi menor em valores

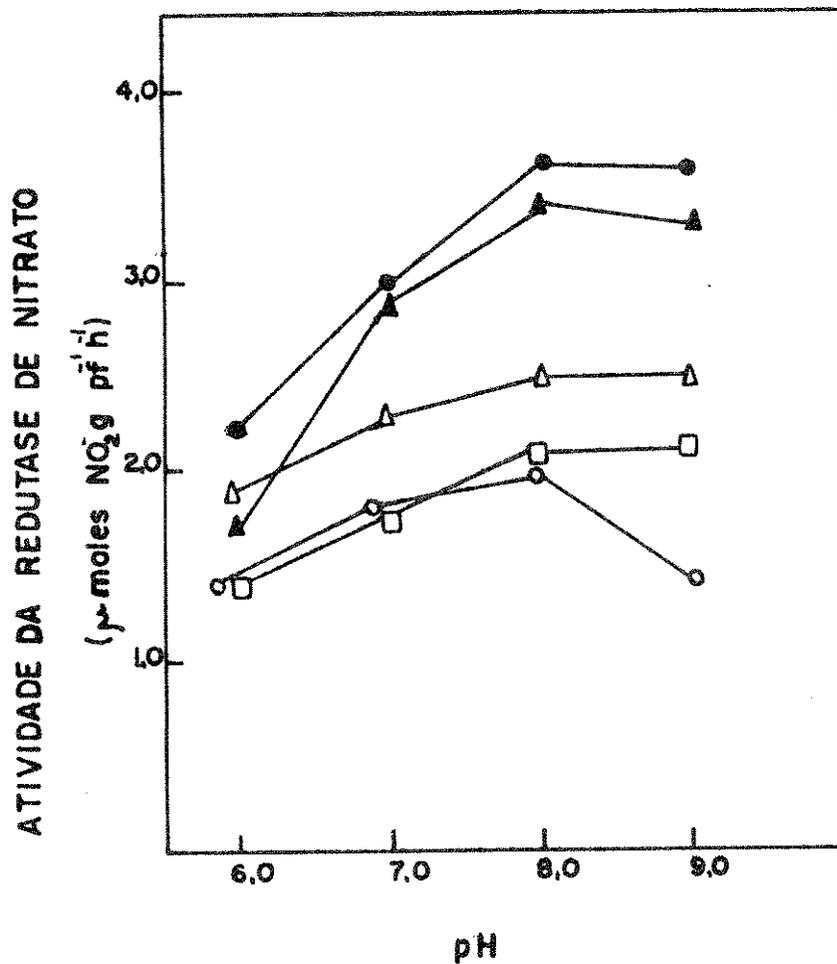


Fig. 5 - Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, em folhas de café. Meio de incubação constituído por tampão fosfato (KH_2PO_4 ou K_2HPO_4), 0,1M e 0,1M de nitrato; pH acertados com HCl 1N. Média de três repetições

(▲) Angustifolia

(□) Catuai

(●) Maragogipe

(○) Mundo Novo

(△) Nacional

mais baixos de pH. A variação do pH do tampão de 6 para 7 foi acompanhada de um aumento na atividade enzimática, sendo mais acentuada no cultivar Angustifolia, onde o acréscimo foi de 70 %; nos demais cultivares o aumento ficou entre 20 % a 40 %. Todos os cultivares apresentaram maior atividade da Redutase de Nitrato em pH 8,0. Em pH 9,0, a atividade permaneceu constante nos cultivares Catuai, Nacional e Maragogipe, e houve diminuição nos cultivares Angustifolia e Mundo Novo. O pH 8,0 foi selecionado para as determinações enzimáticas posteriores.

4.2.3. Efeito de diferentes tampões

Para se verificar a influência da composição do tampão sobre a atividade da Redutase de Nitrato, foram utilizados diferentes produtos, todos na concentração 0,1M, cujos pKa's se aproximassem de valores próximos a 8,0, a saber: Fosfato (K_2HPO_4), pKa = 7,2; Tris (tris hidroximetil amino metano), pKa = 8, Hepes (ácido N-2-hidroximetil N 2 etano sulfônico), pKa = 7,6; Borato ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), pKa = 9,2.

Os resultados constantes na tabela I mostram atividades semelhantes nos tampões Fosfato, Hepes e Tris, indicando

Tabela I - Influência da composição do tampão no meio de infiltração para a determinação da atividade da enzima Redutase de Nitrato *in vivo* em folhas de cafeeiro, do cultivar Mundo Novo. Média de três repetições.

ATIVIDADES DA REDUTASE DE NITRATO	
TAMPÕES	$\mu\text{moles NO}_2^- \text{gpf}^{-1} \text{h}^{-1}$
FOSFATO	1,48
TRIS	1,45
HEPES	1,49
BORATO	0,14

que estes tampões não tem influência diferencial na determinação da atividade enzimática. Com o tampão Borato entretanto, notou-se que a atividade enzimática foi sensivelmente inibida, apresentando valor aproximadamente dez vezes menor comparativamente aos demais tampões incluídos no experimento. Para os estudos posteriores foi utilizado o tampão fosfato.

4.2.4. Efeito da temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura do meio de incubação sobre a atividade da enzima foram utilizados diversos banhos-maria regulados a 25, 30, 33 e 38^oC. Estas faixas de temperatura foram utilizadas em função do conhecimento prévio da temperatura ótima para o ensaio enzimático determinadas para outras espécies de plantas. Os resultados demonstrados na figura 6, indicam que, para todos os cultivares estudados, a atividade da Redutase de Nitrato foi menor em temperatura mais baixa, aumentando a seguir e atingindo sua máxima atividade a 33^oC. Com o aumento da temperatura ocorre, possivelmente, denaturação térmica da proteína refletida na diminuição da atividade enzimática.

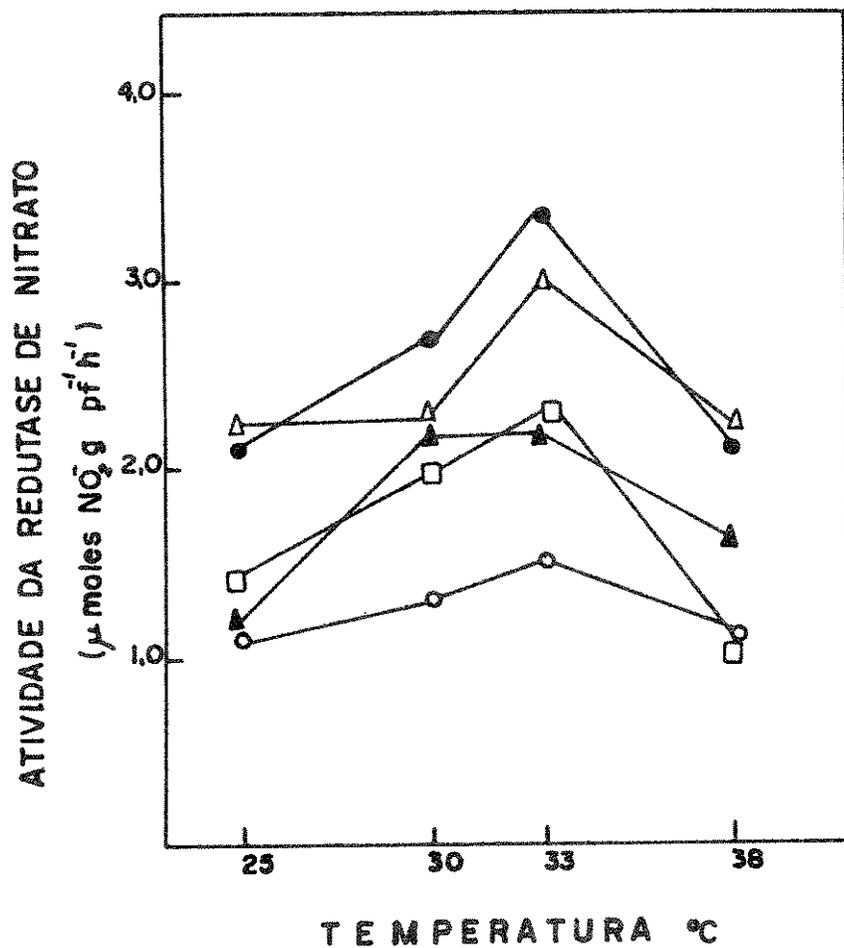


Fig. 6 - Efeito de temperatura do meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*. Média de três repetições.

(▲) Angustifolia

(□) Catuai

(●) Maragogipe

(○) Mundo Novo

(△) Nacional

4.2.5. Efeito de aditivos no meio de infiltração

A utilização de aditivos no meio de incubação com o objetivo de otimizar o ensaio da Redutase de Nitrato, foi estudada por JAWORSKI, 1971; RADIN, 1973; TINGEY *et al.*, 1974; NICHOLAS *et al.*, 1976; JONES e SHEARD, 1977. Em geral, estes aditivos aumentam a permeabilidade celular, facilitando a entrada de nitrato para o tecido e a difusão de nitrito para o meio de incubação (JAWORSKI, 1971).

Foram testados os seguintes aditivos: propanol (0,1% e 1% v/v), tween 20 (0,1 e 1% v/v), triton x 100 (0,1 e 1% v/v) uréia (0,1M), uréia (0,1M) + propanol (1% v/v). Comparativamente à atividade do tratamento controle, sem aditivo, verifica-se pelos resultados constantes na tabela II, para o cultivar Mundo Novo, que todos os aditivos acrescentados no meio de incubação não tiveram efeito significativo no aumento da atividade enzimática.

4.2.6. Efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato.

A fim de verificar a influência das condições impos -

Tabela II - Efeito de aditivos no meio de infiltração sobre a atividade da Redutase de Nitrato em tecido de folha de café, cultivar Mundo Novo. Média de três repetições.

ADITIVOS NO MEIO DE INFILTRAÇÃO	ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO $\mu\text{moles NO}_2\text{gpf}^{-1}\text{h}^{-1}$
SEM ADITIVO	0,9
PROPANOL 0,1 %	1,0
PROPANOL 1 %	1,0
TWEEN 20 0,1 %	1,0
TWEEN 20 1%	0,92
TRITON X 100 0,1 %	1,0
TRITON X 100 1 %	0,85
URÉIA 0,1M	0,93
URÉIA 0,1M + PROPANOL 1 %	1,1

tas durante as determinações do potencial de pressão do xilema pela utilização da bomba de Scholander foi realizado um experimento para determinar possíveis alterações na atividade da Redutase de Nitrato após o tecido ter sido submetido a diferentes pressões externas com nitrogênio. Para tanto, as folhas de café foram cortadas ao meio no sentido longitudinal; uma metade da lâmina foliar foi submetida a pressões graduais durante 30 a 40 segundos de 15 ou 25 atm na bomba de Scholander e a outra, utilizada como controle. As pressões foram eliminadas em 5 segundos, da maneira que o método é normalmente utilizado e a atividade enzimática determinada imediatamente após a retirada do tecido da câmara de pressão.

Os resultados na tabela III mostram que a pressão externa de nitrogênio na faixa de 15 a 20 atm não afetou a atividade da enzima Redutase de Nitrato. Pressões muito acima de 30 atm danificaram o tecido, e o conteúdo celular extravasou para o meio de incubação interferindo na reação colorimétrica do nitrato. Toda vez que foi observada uma coloração anormal nos tubos de reação, estes foram eliminados do ensaio.

Tabela III - Efeito do potencial de pressão sobre a atividade da Redutase de Nitrato, *in vivo*, em folhas de café do cultivar Mundo Novo. Média de três repetições.

TRATAMENTO	ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO % do controle
Tecido foliar não submetido à pressão	100
Tecido foliar submetido à 15 atm	96
Tecido foliar submetido à 25 atm	110

4.3. Efeito da disponibilidade de água para a planta sobre a atividade da enzima Redutase de Nitrato e a Resistência à difusão do vapor d'água na folha.

4.3.1. Atividade da Redutase de Nitrato

4.3.1.1. Cultivar Nacional

As variações da atividade da enzima Redutase de Nitrato em diferentes condições de disponibilidade de água para a planta no cultivar Nacional, são apresentadas na figura 7. No intervalo de potenciais compreendido entre os valores de -10 a -32 atm verifica-se um contínuo decréscimo da atividade da enzima Redutase de Nitrato à medida que o potencial da água da folha diminui.

O teste t, referente ao coeficiente de regressão, foi altamente significativo ao nível de 5 %. Existe portanto, no intervalo estudado, uma relação linear entre os valores dos potenciais da água da folha e a atividade da Redutase de Nitrato.

O decréscimo do potencial da água de -12 atm para -22 atm, ocasionou a queda da atividade da Redutase de Nitrato em

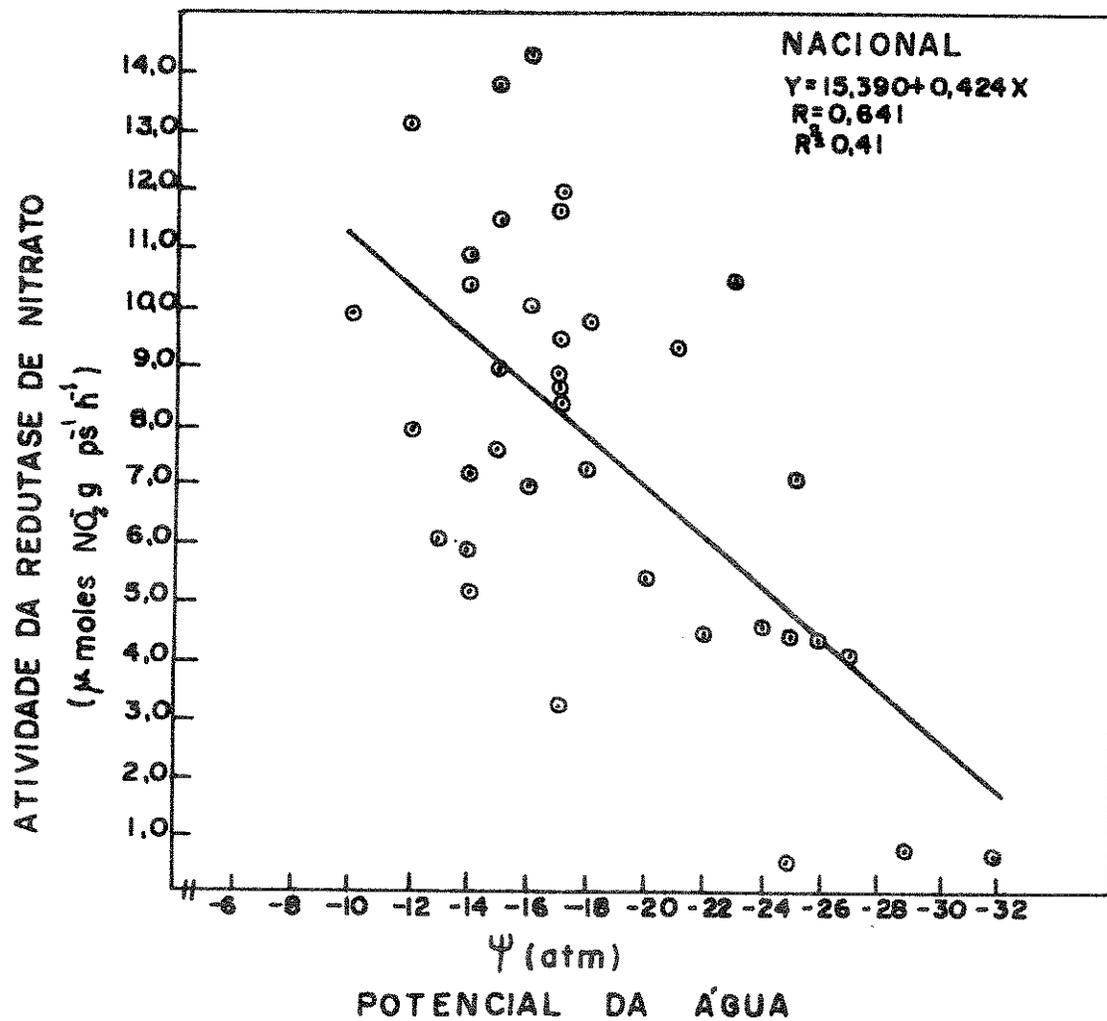


Fig. 7 - Efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, do cultivar Nacional. Diferentes potenciais de água da folha obtidos pela in terrupção da irrigação das plantas.

41 %. Gradativamente, em deficiências crescentes de água, a redução do nitrato ficou prejudicada, atingindo uma diminuição equivalente a 84 % em -32 atm.

Para o cultivar Nacional, a eficiência de incorporação do nitrogênio mineral nas folhas, avaliada pela atividade da Redutase de Nitrato, foi reduzida pela metade quando a planta atingiu o potencial de -23 atm.

4.3.1.2. Cultivar Catuai

A curva representativa do efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato obtida para o cultivar Catuai, é observada na figura 8. A reta de regressão obtida para o cultivar Catuai apresenta uma inclinação menor do que aquela observada para o cultivar Nacional, indicando que a taxa de decréscimo foi menor. Assim, entre valores de potenciais de -12 atm a -22 atm, a redução do nitrato diminuiu em 34 %. Condições crescentes de falta d'água para a planta induziram sucessivas quedas da atividade da Redutase de Nitrato, chegando a atingir em -30 atm, um decréscimo de 64 %. No cultivar Catuai o potencial que induziu uma queda de 50% na atividade enzimática foi de -25,6 atm.

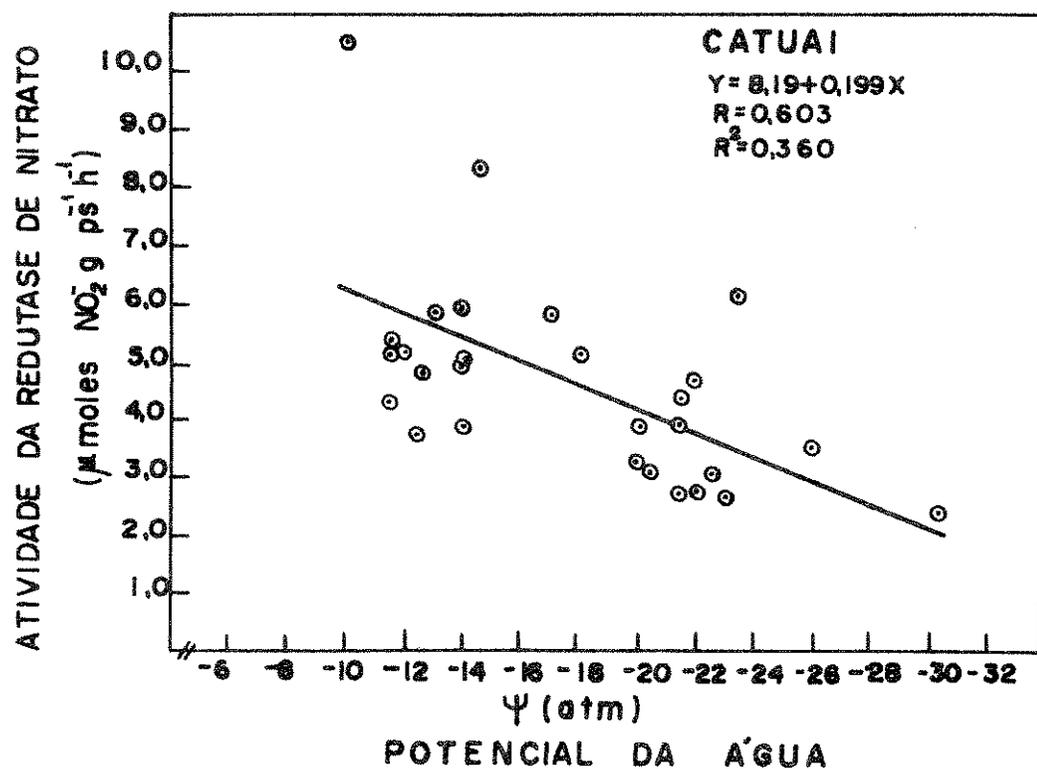


Fig. 8 - Efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, do cultivar Catuai. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela in terrupção da irrigação das plantas

4.3.1.3. Cultivar Maragogipe

O padrão de resposta do cultivar Maragogipe com relação a atividade da Redutase de Nitrato em condições crescentes de limitação hídrica no solo, foi semelhante ao observado para os cultivares Nacional e Catuai, como pode ser observado na figura 9. Existe um decréscimo significativo da atividade da Redutase de Nitrato como resultado da gradativa falta d'água para a planta.

Tomando-se como controle a atividade enzimática no potencial de -12 atm, verifica-se que a atividade da Redutase de Nitrato sofreu um declínio de 45 % em potencial de -22 atm. Em condições mais extremas de falta d'água para a planta, como -32 atm, o decréscimo foi equivalente a 90 %. No cultivar Maragogipe, a redução do nitrato diminui em 50 % quando o potencial da água da folha atingiu o valor correspondente a -22,6 atm.

4.3.1.4. Cultivar Mundo Novo

O comportamento do cultivar Mundo Novo no que se refere a atividade da Redutase de Nitrato, em condições de deficiência hídrica, se assemelha ao cultivar Maragogipe, como pode ser

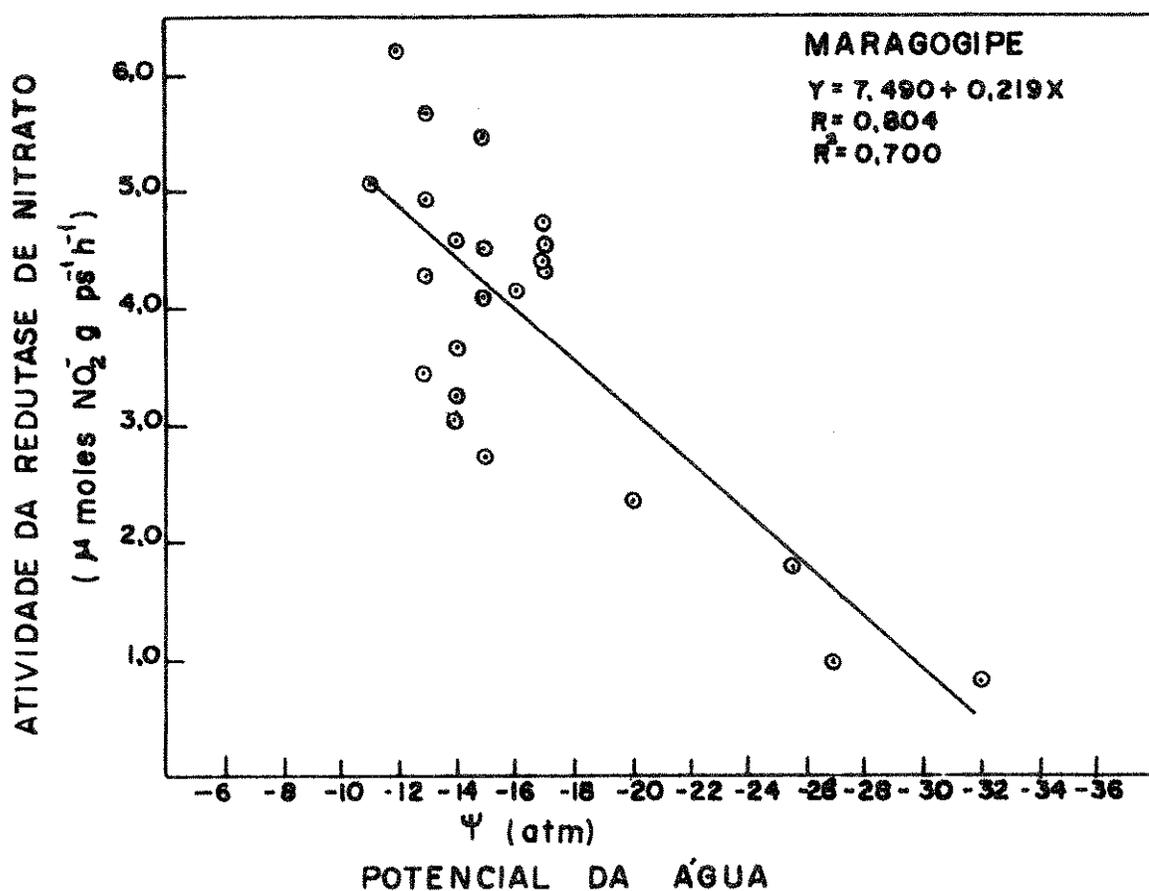


Fig. 9 - Efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, do cultivar Maragogipe. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

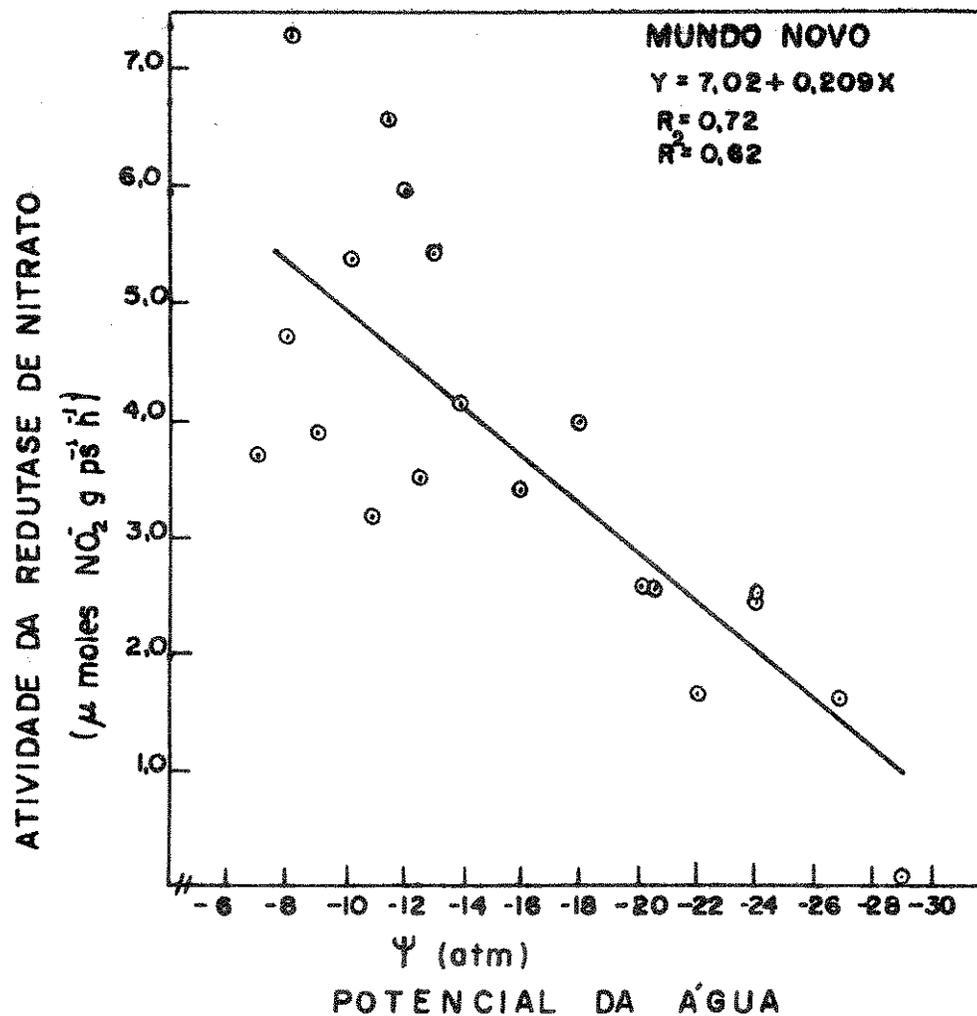


Fig. 10 - Efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, do cultivar Mundo Novo. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

verificado na figura 10. Com a diminuição do potencial da água de -12 para -22 atm, a atividade da Redutase de Nitrato decreceu 46 %. A atividade da Redutase de Nitrato foi sensivelmente prejudicada com o aumento da deficiência hídrica, alcançando a -29 atm um declínio de 83 %. O potencial, no qual a atividade da Redutase de Nitrato ficou reduzida pela metade, foi de -20 atm.

4.3.1.5. Cultivar Angustifolia

A curva de resposta do cultivar Angustifolia pode ser verificada na figura 11. Comparada com o potencial de -12 atm, nota-se que a atividade da Redutase de Nitrato diminuiu em 59 % em potencial de -22 atm. Reduções do potencial da água da planta, corresponderam decrêscimos da atividade da Redutase de Nitrato atingindo uma diminuição de 84 %, quando o potencial da água foi de -26 atm. No cultivar Angustifolia, a diminuição em 50 % do processo de incorporação do nitrogênio mineral foi verificado em potenciais mais altos que nas demais variedades ou seja, -19,5 atm.

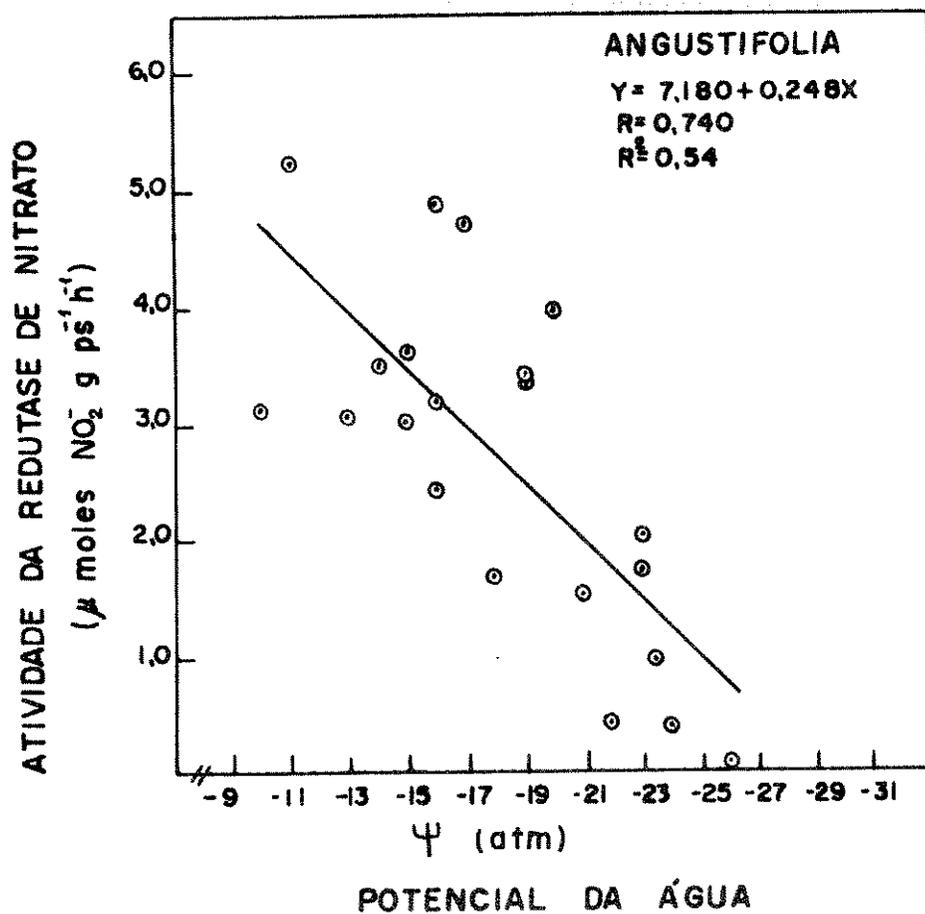


Fig. 11 - Efeito do potencial da água da folha sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, do cultivar Angustifolia. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

No estudo comparativo entre os diferentes cultivares observa-se, que a atividade da Redutase de Nitrato em folhas de café, sob condições de laboratório, responde as variações de falta d'água no solo, podendo-se constituir em um parâmetro indicativo na avaliação do efeito da deficiência de água sobre o comportamento fisiológico da planta.

A suscetibilidade da enzima Redutase de Nitrato à falta d'água foi observada por vários autores (MATTAS e PAULI, 1965; HUFFAKER *et al.*, 1970; BARDZIK *et al.*, 1971; MARANVILLE e PAULSEN, 1972; MORILLA *et al.*, 1973; PLAUT, 1973 e 1974; SHANER e BOYER, 1976).

MATTAS e PAULI (1965) notaram em plântulas de milho, que a atividade da Redutase de Nitrato decresceu rapidamente, antes mesmo dos sintomas de falta d'água tornarem-se evidentes. HUFFAKER *et al.* (1970) observaram que em plântulas de cevada a atividade da Redutase de Nitrato diminuiu à medida que o potencial da água decresceu. BARDZIK *et al.* (1971) e MARANVILLE e PAULSEN (1972) encontraram uma diminuição da atividade da Redutase de Nitrato em plântulas de milho, quando o conteúdo relativo de água na folha foi reduzido de 10 a 20 %. MORILLA *et al.* (1973) observaram em plântulas de milho uma redução na atvida-

de da Redutase de Nitrato com o declínio do potencial da água da folha além de -2bars sendo 25% do controle quando o potencial foi de -13bars. Em plântulas de trigo ocorreu um decréscimo significativo da atividade da Redutase de Nitrato quando o conteúdo relativo de água foi reduzido em cerca de 7 % (PLAUT, 1973 e 1974).

O decréscimo da atividade da Redutase de Nitrato em condições de falta d'água pode ser devido a redução na taxa de síntese da enzima ou a uma intensificação na taxa de degradação, resultando um novo equilíbrio entre os dois processos (BARDZIK, 1971). MORILLA *et al.* (1973) relacionaram o declínio da atividade da Redutase de Nitrato em condições de deficiência hídrica, com a diminuição da taxa de síntese da enzima. SHANER e BOYER (1976) concluíram que em baixos potenciais de água, a inibição da Redutase de Nitrato foi resultado da diminuição do fluxo de nitrato para as folhas na corrente transpiratória.

A comparação dos coeficientes de regressão obtidos pelo teste t para a análise das diferenças entre os cultivares quanto a atividade da Redutase de Nitrato sob condições de deficiência hídrica, pode ser observada na tabela IV. Os resultados

Tabela IV - Comparação entre os coeficientes de regressão das curvas de respostas da atividade da Redutase de Nitrate sob condições de deficiência hídrica.

VARIETADE	VALOR DE t
Catuai vs Angustifolia	0,62 (N.S)
Catuai vs Mundo Novo	0,15 (N.S)
Catuai vs Maragogipe	0,3 (N.S)
Catuai vs Nacional	2,12 (*)
Angustifolia vs Mundo Novo	0,59 (N.S)
Angustifolia vs Maragogipe	0,47 (N.S)
Angustifolia vs Nacional	1,31 (N.S)
Mundo Novo vs Maragogipe	0,19 (N.S)
Mundo Novo vs Nacional	2,02 (N.S)
Maragogipe vs Nacional	1,78 (N.S)

(*) Significativo ao nível de 5 %

(N.S) Não significativo

indicam, diferenças significativas ao nível de 5 % entre os cultivares Nacional e Catuai. Para os outros cultivares as diferenças não são significativas.

No presente trabalho, a atividade da enzima Redutase de Nitrato em resposta às variações da disponibilidade de água para a planta, permitiu a discriminação de dois cultivares. Trabalhos em condições de campo poderão ser realizados visando estabelecer o método como um critério adicional na seleção de plantas melhor adaptadas a condições extremas de falta d'água. Aliado ao comportamento fisiológico, estes estudos deverão envolver a análise genética das características.

4.3.2. Resistência à difusão do vapor d'água

A regulação estomática à perda d'água, observada pelo aumento da resistência foliar à difusão do vapor d'água em resposta ao decréscimo do potencial da água na planta, foi evidente em todos os cultivares de café estudados.

4.3.2.1. Cultivar Nacional

Nota-se, pela figura 12, o efeito da variação do potencial da água da folha sobre a resistência à difusão do vapor d'água no cultivar Nacional. Os resultados analisados pelo teste t indicaram que o coeficiente de regressão, ao nível de 5 %, foi diferente de zero havendo portanto, uma relação do tipo linear entre o potencial da água da folha e a resistência difusiva no intervalo de potencial entre -10 a -32 atm. Existe uma correlação negativa entre os valores de potenciais da água na folha e a resistência difusiva; à medida que diminuiu o potencial da água, aumentou o valor da resistência difusiva.

No presente trabalho, o maior valor do potencial da água estimado para este cultivar foi de -10atm, mesmo com total disponibilidade de água para a planta. Neste potencial, o valor da resistência difusiva foi equivalente a $9,16 \text{scm}^{-1}$, indicando que mesmo em condições onde aparentemente não existe limitação hídrica nas raízes, a planta oferece resistência à perda d'água pelas folhas como uma maneira de manter o equilíbrio hídrico. A variação do potencial da água da folha de -12 para -22atm correspondeu um aumento da resistência difusiva equivalente a 127 % ,

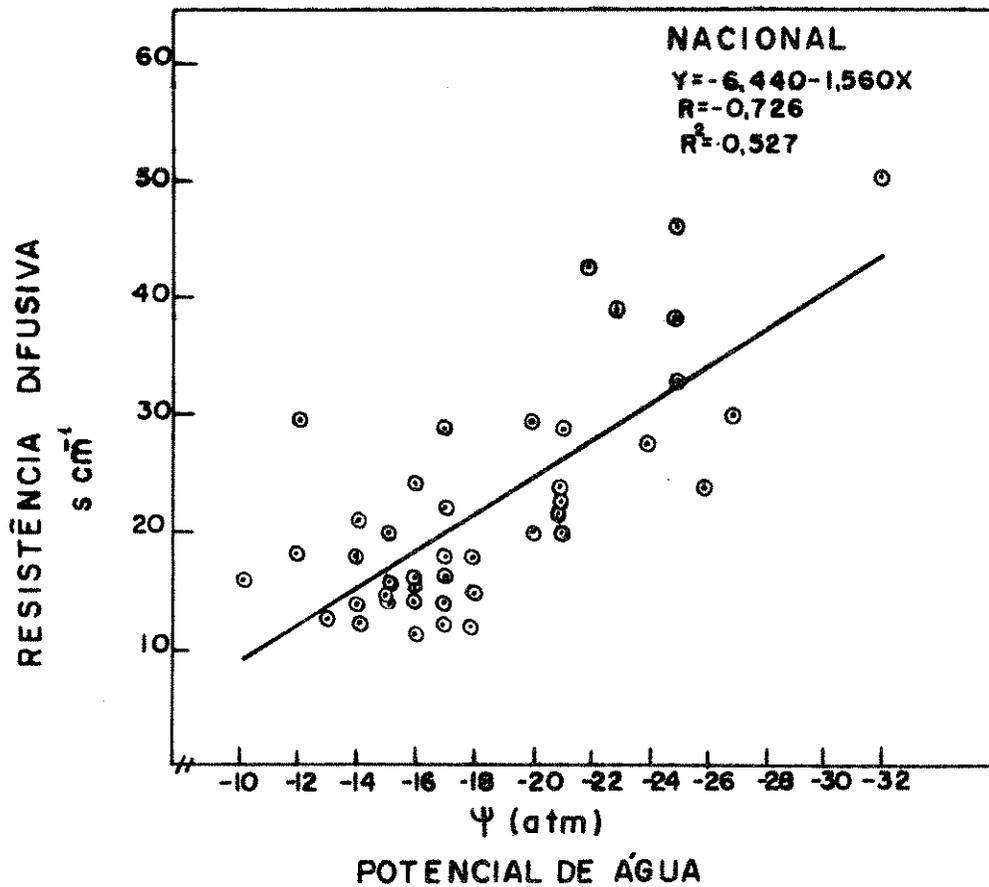


Fig. 12 - Efeito do potencial da água da folha sobre a resistência à difusão do vapor d'água, do cultivar Nacional. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

sugerindo um controle eficiente à perda d'água, representado principalmente pelos estômatos. Em condições mais extremas de falta d'água para a planta, como a -32atm de potencial de água na folha, o aumento da resistência difusiva foi de 375 %.

Para o cultivar Nacional, o valor da resistência difusiva dobrou quando o potencial da água da folha atingiu o valor de -16atm.

4.3.2.2. Cultivar Catuai

No cultivar Catuai nota-se que o padrão de variação da resistência difusiva em resposta à diminuição da disponibilidade de água para a planta, foi semelhante àquele observado para o cultivar Nacional (Figura 13). Existe um aumento significativo dos valores da resistência difusiva com a diminuição dos potenciais da água da folha. Com a diminuição do potencial da água de -12atm para -22atm, foi observado um aumento de 284% e a -24atm um acréscimo equivalente a 341 %, indicando que a planta apresenta controles muito eficientes para a manutenção do seu equilíbrio hídrico. No cultivar Catuai, o potencial no qual o valor da resistência à difusão do vapor d'água aumentou

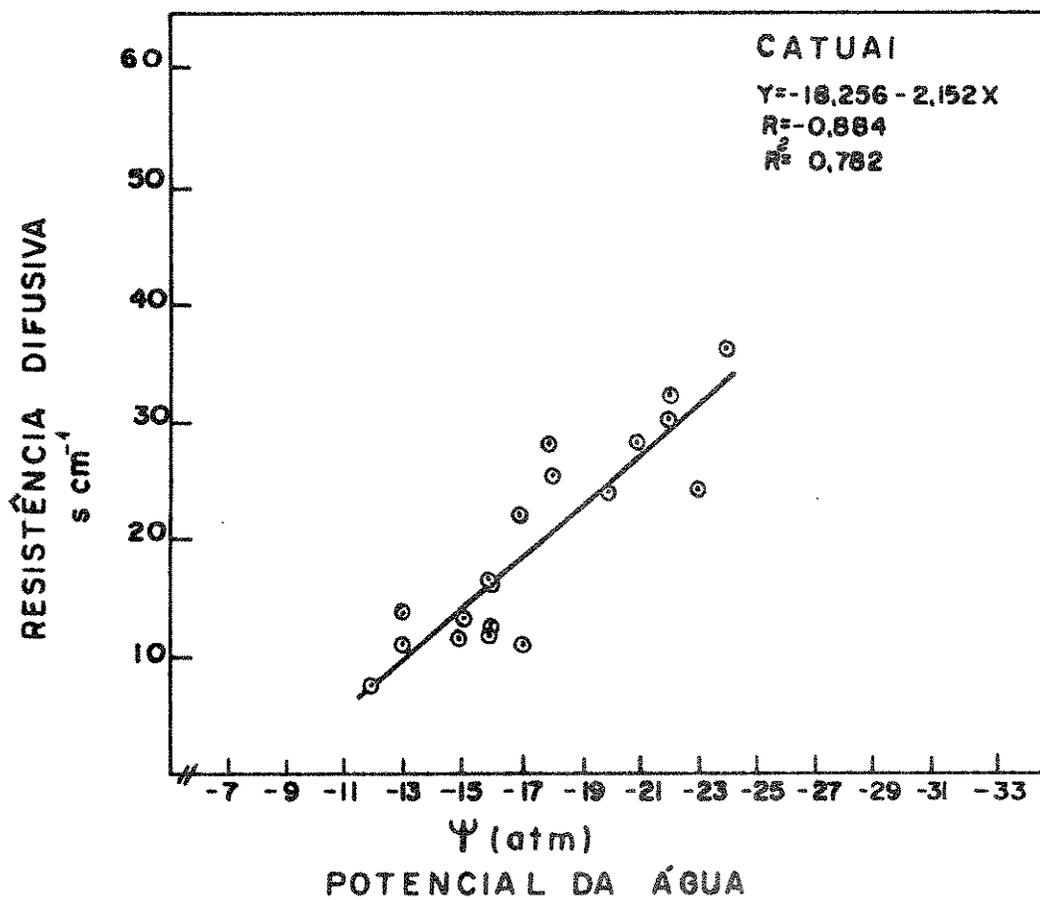


Fig. 13 - Efeito do potencial da água da folha sobre a resistência à difusão do vapor d'água, do cultivar Catuai. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

em 50 %, foi de -15,5atm.

4.3.2.3. Cultivar Maragogipe

No cultivar Maragogipe o controle estomático à perda d'água, representado pela resistência difusiva das folhas, apresentou alterações sensíveis às variações do potencial da água como pode ser observado na figura 14. A relação linear existente entre o potencial da água da folha e a resistência difusiva, também foi verificada neste cultivar. A queda do potencial da água de -12atm para -22atm representou um acréscimo de 122% no valor da resistência difusiva. Com a diminuição do potencial da água para -35atm, o aumento da resistência difusiva correspondeu a 332 %. O valor da resistência difusiva foi duplicado, em potencial da água equivalente a -18atm.

4.3.2.4. Cultivar Mundo Novo

O comportamento das folhas com respeito à difusão do vapor d'água do cultivar Mundo Novo, em condições de potenciais decrescentes de água, é apresentado na figura 15. Neste cultivar, a curva de resposta da resistência difusiva foi semelhante

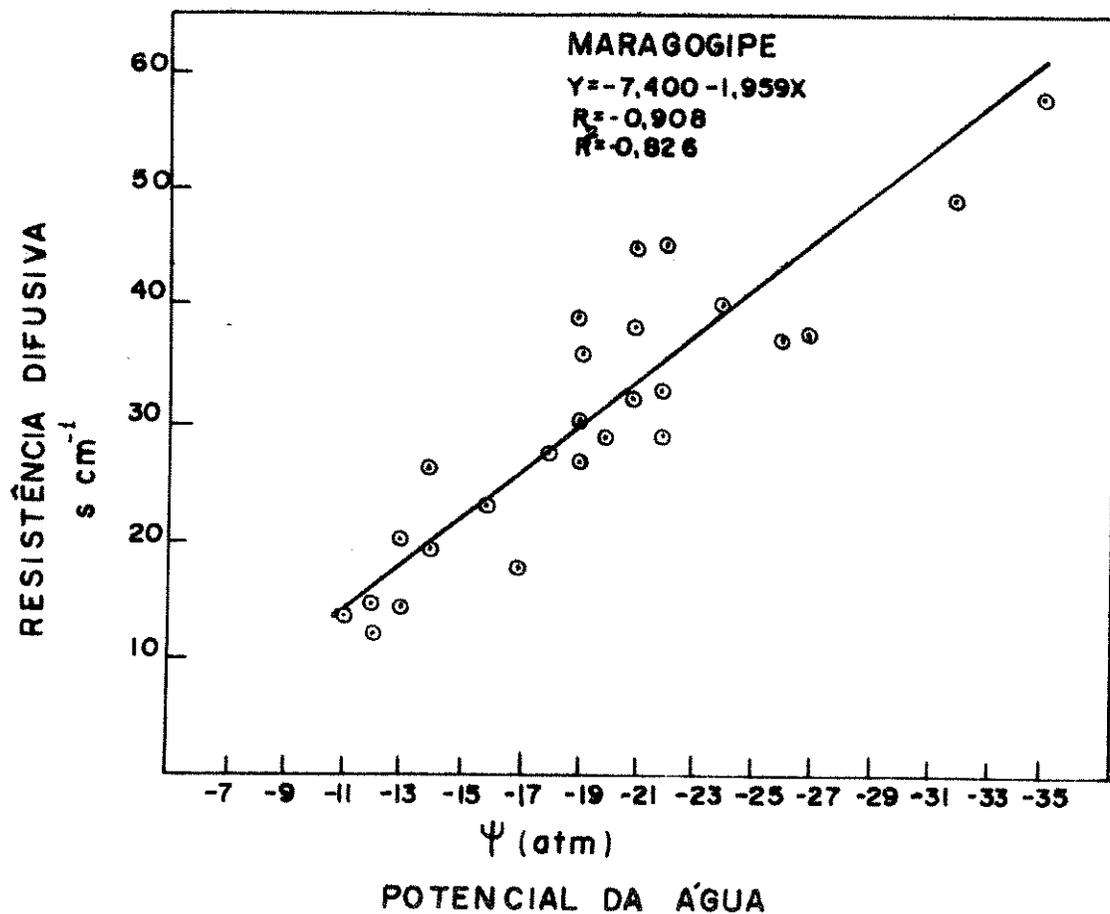


Fig. 14 - Efeito do potencial da água da folha sobre a resistência à difusão do vapor d'água, do cultivar Maragogipe. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

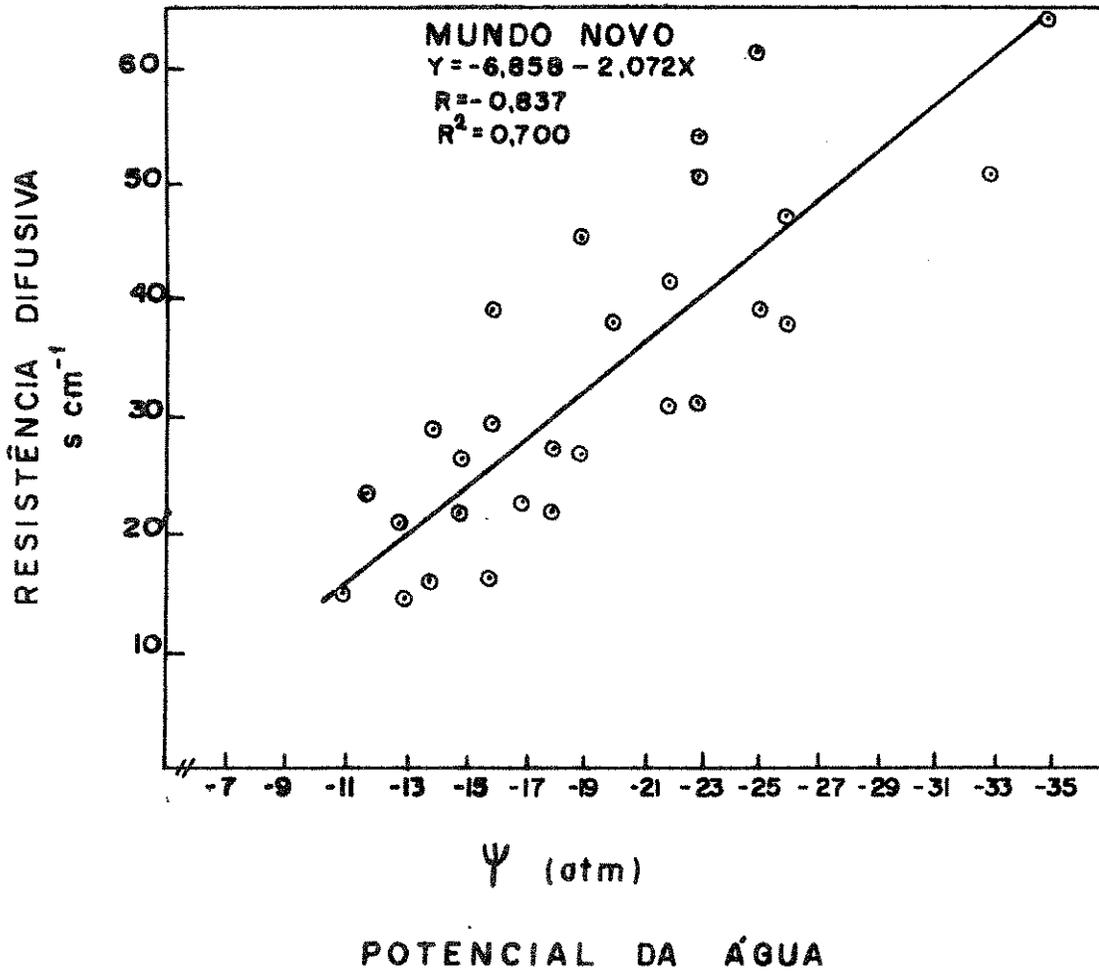


Fig. 15 - Efeito do potencial da água da folha sobre a resistência à difusão do vapor d'água, do cultivar Mundo Novo. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

ao observado para o cultivar Maragogipe. A variação do potencial da água de -12atm para -22atm provocou um acréscimo de 115 % no valor da resistência difusiva. As diminuições gradativas dos potenciais da água da folha corresponderam aumentos dos valores da resistência à difusão do vapor d'água que a -35 atm chegou a 312 %. Para o cultivar Mundo Novo, o valor da resistência difusiva dobrou, quando o potencial da água atingiu o valor correspondente a -19atm.

4.3.2.5. Cultivar Angustifolia

Observa-se pela figura 16, a linearidade de resposta apresentada pelo cultivar Angustifolia quanto ao parâmetro resistência difusiva foliar em deficiências crescentes de água na planta. O declínio do potencial de -12atm para -22atm induziu um aumento da resistência difusiva de 118 %, e com a diminuição para -25atm, o aumento foi de 518 %. O acréscimo em 50% do valor da resistência difusiva, foi verificado em potencial equivalente a -10,5atm.

Portanto, nos cultivares de café estudados, podem ser observados respostas bastante evidentes dos estômatos com res -

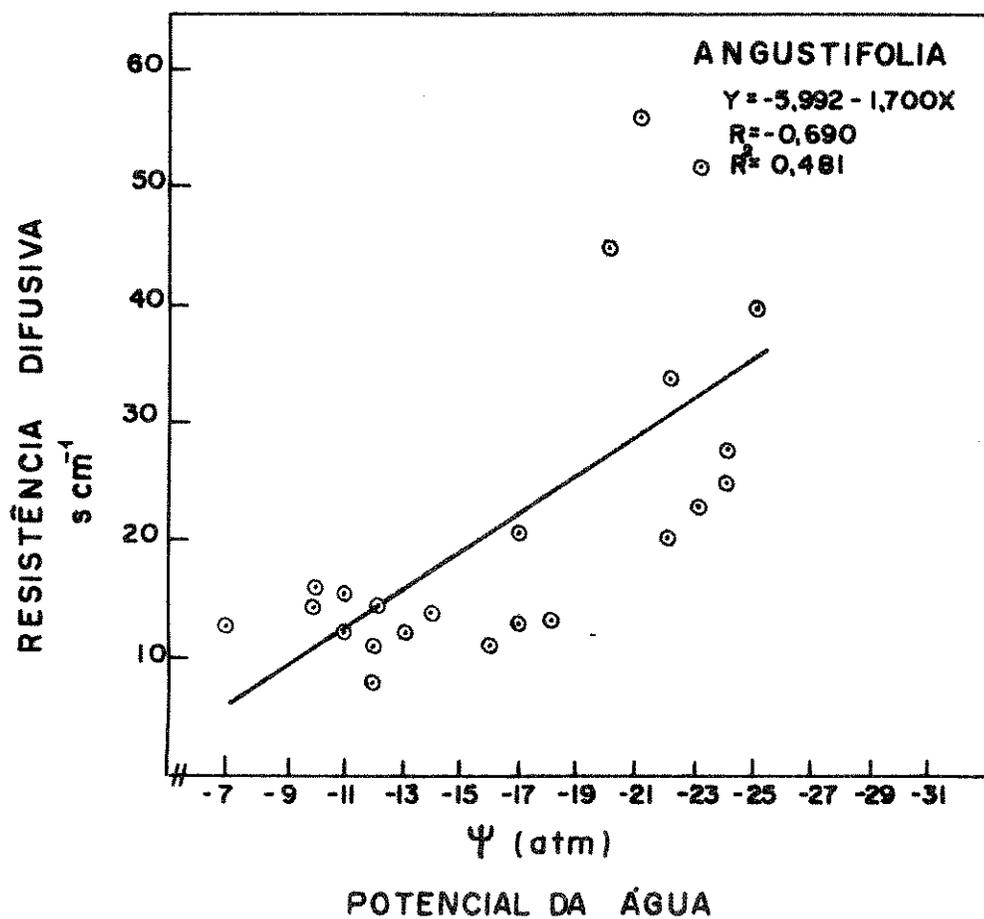


Fig. 16 - Efeito do potencial da água da folha sobre a resistência à difusão do vapor d'água, do cultivar *Angustifolia*. Diferentes potenciais da água da folha obtidos pela interrupção da irrigação das plantas.

peito a regulação da perda d'água pela planta.

Numerosos estudos mostraram, em várias espécies de plantas, que existe uma relação entre a resistência foliar à difusão do vapor d'água, principalmente representados pelos estômatos, e o potencial da água da folha. Em geral, a abertura estomática não é muito afetada até o potencial da água atingir um valor limite, a partir do qual ocorre uma súbita alteração no comportamento dos estômatos, que iniciam um rápido processo de fechamento em resposta à crescente restrição de água para a planta (HSIAO, 1973; BEGG e TURNER, 1976). Entretanto, nos cultivares de café estudados, o valor limite do potencial da água da folha correspondente à alteração do comportamento dos estômatos não foi observado. É provável que a não obtenção dos valores limites como descrito em trabalhos com outras espécies, seja devido a diferenças na metodologia empregada para a estimativa da resistência à difusão do vapor d'água. No presente trabalho, as resistências difusivas foram determinadas a partir dos valores da transpiração em plantas individuais mantidas em pote, enquanto que, em trabalhos de outros autores foi utilizado o porômetro de difusão. Por outro lado, a utilização

do porômetro de difusão, que é aplicado diretamente na lâmina foliar, pode induzir alterações no comportamento estomático devido a uma situação artificial a que eles estariam submetidos, causando assim, dificuldades para a obtenção de valores mais representativos, como aqueles que julgamos que foram conseguidos através da metodologia empregada neste trabalho.

As diferenças no padrão de variação do comportamento estomático em condições de deficiência hídrica são bem estabelecidas em diferentes espécies de plantas (TURNER, 1974; BEADLE *et al.*, 1973), embora as comparações intervarietais se restrinjam a um pequeno número de trabalhos (HENZELL *et al.*, 1975 e 1976; BLUM, 1974; CARLSON *et al.*, 1979).

Nos cultivares de café estudados, a comparação pelo teste t entre os coeficientes de regressão das curvas de resposta da resistência à difusão do vapor d'água em déficits crescentes de água, pode ser observada na tabela V. Ao nível de 5 %, não foram verificadas diferenças significativas dos coeficientes de regressão para todos os cultivares. O parâmetro de resistência à difusão do vapor d'água no presente trabalho não discriminou os cultivares de café com relação à variação da disponibilidade de água para a planta.

Tabela V - Comparação entre os coeficientes de regressão das curvas de resposta da resistência à difusão do vapor d'água sob condições de deficiência hídrica.

VARIEDADES	VALOR DE t	
Catuai vs Maragogipe	0,5	(N.S)
Catuai vs Nacional	1,25	(N.S)
Catuai vs Angustifolia	0,73	(N.S)
Catuai vs Mundo Novo	0,16	(N.S)
Angustifolia vs Mundo Novo	0,86	(N.S)
Angustifolia vs Maragogipe	0,67	(N.S)
Angustifolia vs Nacional	0,34	(N.S)
Mundo Novo vs Maragogipe	0,35	(N.S)
Mundo Novo vs Nacional	1,5	(N.S)
Maragogipe vs Nacional	1,3	(N.S)

(N.S) Não significativo ao nível de 5 %.

5. CONCLUSÃO

As melhores condições para a determinação da atividade da Redutase de Nitrato *in vivo*, em folhas de cafeeiro, são: 0,1M de nitrato no meio de incubação constituído por tampão fosfato, pH 8,0, temperatura de incubação de 33°C e a retirada de alíquotas após 15 a 75 minutos do início da reação. Máxima atividade enzimática ocorre após 4 a 5 horas de iluminação. As folhas de café fisiologicamente maduras para a determinação da atividade enzimática correspondem ao 3º par de folhas. Os aditivos no meio de incubação, não são efetivos no aumento da atividade enzimática.

Existe uma linearidade de resposta da atividade da Redutase de Nitrato em déficits crescentes de água. As reduções gradativas do potencial da água da folha correspondem diminuições sucessivas da atividade enzimática. A enzima Redutase de Nitrato pode se constituir num parâmetro indicativo do

efeito da deficiência de água no solo sobre as plantas de café.

A Redutase de Nitrato discriminou os cultivares Catu ai e Nacional em suas respostas à deficiência de água no solo.

A medida do comportamento estomático das folhas de café, representado pela resistência à difusão do vapor d'água, é sensível às variações de disponibilidade de água no solo. De crêscimos dos potenciais da água da folha são acompanhados pelos aumentos da resistência difusiva, indicando a existência de um eficiente controle estomático à perda d'água para a manutenção do balanço hídrico da planta.

O valor da resistência à difusão do vapor d'água não consiste um parâmetro discriminatório das variedades de café, em condições de deficiência hídrica.

6. RESUMO

O estudo para a avaliação do efeito da deficiência de água sobre a enzima Redutase de Nitrato e a resistência à difusão do vapor d'água foi realizado em cultivares de café (*Coffea arabica* L.), em condições controladas de ambiente. Os cultivares utilizados foram os seguintes: Nacional, Catuai, Maragogipe, Mundo Novo e Angustifolia. Durante os experimentos, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento, regulada para a temperatura de 28°C durante o dia e 20°C à noite e 12 horas de fotoperíodo.

O método de determinação da atividade da Redutase de Nitrato *in vivo* foi padronizado para tecido de folhas de cafeeiro. As condições otimizadas para a determinação da atividade enzimática foram: meio de incubação constituído por tampão fosfato (0,1M), pH 8,0 e adição de nitrato 0,1M; temperatura de incubação de 33°C. O tempo de reação foi de 60 minutos e o tecido

(discos de folhas) foi retirado preferencialmente do 3º par de folhas a partir do ápice, após 4 a 5 horas do início do período de iluminação.

Diferentes potenciais da água da folha foram induzidos pela interrupção da irrigação das plantas por vários períodos de tempo. A avaliação do potencial da água foi feita pela bomba de pressão de Scholander. Os valores da resistência à difusão do vapor d'água nas folhas foram calculados pela fórmula de GAASTRA (1959), a partir de medidas simultâneas da taxa de transpiração, temperatura da folha e do ar circundante, e concentração do vapor d'água da atmosfera da câmara de crescimento.

Experimentos preliminares indicaram que a atividade da Redutase de Nitrato não foi afetada pelo tratamento das folhas com pressões crescentes na bomba de Scholander até 25atm.

A atividade da Redutase de Nitrato nos cultivares estudados, diminuiu com o decréscimo do potencial da água da folha. A variação do potencial da água de -12 para -22 atm, correspondeu uma diminuição da atividade da Redutase de Nitrato equivalente a 34 % no cultivar Catuai, 41 % em Nacional, 45 %

em Maragogipe, 46 % em Mundo Novo e 59 % em Angustifolia.

A eficiência de incorporação do nitrogênio mineral representada pela Redutase de Nitrato foi reduzida à metade em potenciais de água semelhantes a -25,6atm em Catuai, -23atm em Nacional, -22 atm em Maragogipe, -20 atm em Mundo Novo e -19,5 atm em Angustifolia. Da comparação dos coeficientes de regressão da reta de regressão obtida para a Redutase de Nitrato, referente aos cultivares estudados, foram observadas diferenças significativas entre os cultivares Nacional e Catuai.

A sensibilidade de resposta da enzima Redutase de Nitrato às variações de falta d'água no solo sugere a sua utilização como parâmetro na avaliação do efeito da falta d'água sobre o comportamento fisiológico das plantas de cafeeiro.

O comportamento estomático avaliado pela resistência à difusão do vapor d'água, foi suscetível ao decréscimo do potencial da água na planta. Observou-se que a redução do potencial de -12atm para -22atm foi acompanhada por um aumento da resistência difusiva equivalente a 284 % no cultivar Catuai, 127 % em Nacional, 122 % em Maragogipe, 118 % em Angustifolia e 115 % em Mundo Novo.

A resistência à difusão do vapor d'água foi duplicada quando o potencial da água atingiu valores equivalentes a -10,5atm em Angustifolia, -15,5atm em Catuai, -16atm em Nacional, -18atm em Maragogipe e -19atm em Mundo Novo. Da comparação dos coeficientes de regressão da reta de regressão obtida para a resistência à difusão do vapor d'água, não foram observadas diferenças significativas entre os cultivares de café estudados.

7. SUMMARY

The evaluation of the effect of water stress on nitrate reductase activity and leaf diffusive resistance was carried out in *Coffea arabica* L. cultivars, grown in pots filled with red podzolic soil, under controlled temperature conditions of 28°C/20°C. The select cultivars for study were:

Nacional, Catuai, Maragogipe, Mundo Novo and Angustifolia.

In the first phase of the work the method of determination of leaf nitrate reductase activity *in vivo* was standardized as follows:

- a) incubation medium containing 0,1 M phosphate buffer, pH 8.0, 0,1 M potassium nitrate;
- b) reaction time of 60 minutes;
- c) assay temperature 33°C. Sampling of tissue was done using the 3rd pair of leaves taken from a plagiotropic branch, 4 to 5 hours after beginning of the illumination period.

Leaf water potential was determined with the Scholander's pressure bomb. Leaf diffusive resistance to water vapor was calculated by the method of Gaastra (1959) through the simultaneous measurement of transpiration rate, leaf and air temperature and concentration of water vapour of the atmosphere surrounding the plants. Water deficits were imposed by withholding irrigation.

Preliminary experiments indicated that nitrate reductase activity was not affected when leaves were subjected to pressures up to 25 atm in the Scholander's bomb.

In all cultivars, the activity of nitrate reductase decreased with decreasing leaf water potential in a statistically significant linear pattern. In the range of water potential between -12 and -22 atm nitrate reductase activity decreased 34 % in cv. Catuai, 41 % in cv Nacional, 45 % in cv Maragogipe, 46 % in cv Mundo Novo and 50 % in cv Angustifolia.

The ability of leaves to reduce nitrate showed 50 % decrease when leaf water potential reached -25,5 atm in cv Catuai, -23 atm in cv Nacional, -22 atm in cv Maragogipe, -20 atm in cv Mundo Novo and -19,5 atm in cv Angustifolia. Significant

differences of the effect of water stress on the activity of nitrate reductase were observed between the cultivars Catuai and Nacional, the former being more tolerant to water deficits in relation to nitrate reduction.

Decreasing leaf water potential between -12 and -22 atm caused a significant increase of leaf diffusive resistance which reached 284 % in Catuai, 127 % in Nacional, 122 % in Maragogipe, 118 % in Angustifolia and 115 % in Mundo Novo. The leaf diffusive resistance was doubled when leaf water potential reached -10,5 atm in Angustifolia, -15,5 atm in Catuai, -16atm in Nacional, -18 atm in Maragogipe and -19 atm in Mundo Novo . Statistical analyses of the effect of water deficits on leaf diffusive resistance revealed no significant differences among cultivars.

Determination of the *in vivo* activity of nitrate reductase in leaves indicated that the method may be utilized as a suitable criterium for the evaluation of the effect of water stress on the physiological behaviour of coffee plants.

8. BIBLIOGRAFIA

- ACEVEDO, E.; TSIAO, T.C. e HENDERSON, D.W. 1971. Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water stress. *Plant Physiol.* 48: 631-636.
- ACKERSON, R.C. e KRIEG, D.R. 1977. Stomatal and nonstomatal regulation of water use in cotton, corn and sorghum. *Plant Physiol.* 60: 850-853.
- ACKERSON, R.C.; KRIEG, D.R.; HARING, C.L. e CHIANG, N. 1977. Effects of plant water status on stomatal activity, photosynthesis and nitrate reductase activity of field grown cotton. *Crop Sci.* 17: 81-84.
- ALOFÉ, C.D; SCHRADER, L.E. e SMITH, R.R. 1973. Influence of high day and variable night temperatures on nitrate reductase activity of young corn (*Zea mays* L.) plants. *Crop Sci.* 13: 625-629.

- ALVIM, P.T. e HAVIS, J.R. 1954. An improved infiltration series for studying stomatal opening as illustrated with coffee. *Plant Physiol.* 29: 97-98.
- ANGELOCCI, L.R. e MAGALHÃES, A.C. 1977. Estimating leaf water potential of coffee with the pressure bomb. *Turrialba* 27 (3): 305-306.
- ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C.; RAINS, D.W. e RAO, K.P. 1979. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiology*. 63: 1205-1209.
- BARDZIK, J.M.; MARSH, JR, H.V. e HAVIS, J.R. 1971. Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. *Plant Physiol.* 47: 828-831.
- BARLOW, E.W.R.; MUNNS, R.; SCOTT, N.S. e REISNER, A.H. 1977. Water potential, growth and polyribosome content of the stressed wheat apex. *J. Exp. Bot.* 28 (105): 909-916.
- BARNETT, N.M. e NAYLOR, A. 1966. Aminoacid and protein metabo -

lism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* 41: 1222-1230.

BEADLE, C.L.; STEVENSON, K.R.; NEUMANN, H.H.; THURTELL, G.H. e KING, K.M. 1973. Diffusive resistance, transpiration and photosynthesis in single leaves of corn and sorghum in relation to leaf water potential. *Can. J. Plant Sci.* 53:537-544.

BEADLE, C.L.; TURNER, N.C. e JARVIS, P.G. 1978. Critical water potential for stomatal closure in sitka spruce. *Physiol Plant.* 43: 160-165.

BEARDSELL, M.F. e COHEN, D. 1975. Relationships between leaf water status, abscisic acid levels and stomatal resistance in maize and sorghum. *Plant Physiol.* 56: 207-212.

BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 495-522.

BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1972. The role of light in nitrate metabolism in higher plants. Em: *Photophysiology*, vol. VII,

A.P. Inc. N.Y. and London.

- BEEVERS, L.; SCHRADER, L.E.; FLESHER, D. e HAGEMAN, R.H. 1965. The role of light and nitrate in the reduction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiol.* 40: 691-695.
- BEGG, J.E. e TURNER, N.C. 1976. Crop water deficits. *Adv. Agron.* 28: 161-217.
- BELL, D.T.; KOEPPE, D.E. e MILLER, R.J. 1971. The effects of drought stress on respiration of isolated corn mitochondria. *Plant Physiol.* 48: 413-415.
- BENZIONI, A. e HEIMER, Y.M. 1977. Temperature effect on nitrate reductase activity *in vivo*. *Plant Sci. Lett.* 9: 225 - 231.
- BENZIONI, A.; ITAI, C. e VAADIA, Y. 1967. Water and salt stresses, Kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 42: 361-365.

- BILAL, I.M. e RAINS, R.W. 1973. In vivo characterization of nitrate reductase activity in cotton. *Physiol. Plant.* 28:237-243.
- BLUM, A. 1974. Genotypic responses in sorghum to drought stress I. Response to soil moisture stress. *Crop Sci.* 14: 361-364.
- BOYER, J.S. 1968. Relationships of water potential to growth of leaves. *Plant Physiol.* 43: 1056-1062.
- BOYER, J.S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiol.* 46: 233-235.
- BOYER, J.S. 1971. Nonstomatal inhibition of photosynthesis in sunflower at low leaf water potentials and high light intensities. *Plant Physiol.* 48: 532-536.
- BOYER, J.S. 1976. Water deficits and photosynthesis. In: Water deficits and plant growth. T.T. Kozlowski vol. IV. Academic Press.

- BOYER, J.S. e BOWEN, B.L. 1970. Inhibition of oxygen in chloroplasts isolated from leaves with low water potentials. *Plant Physiol.* 45: 612-615.
- BOYER, J.S. e MCPHERSON, H.G. 1975. Physiology of water deficits in cereals crops. *Adv. Agron.* 27: 1-23.
- BRAVO, C.M. e FERNANDEZ, C.E. 1964. Respuesta de plantas jóvenes de café a la aplicación de tres niveles de humedad en el suelo y dos fertilizantes nitrogenados. *Turrialba* 4 (1): 15-23.
- BREALLY, O. e CARVAJAL, J.F. 1971. La actividad de la reductasa del nitrato como guía de la fertilización nitrogenada del café. Em: IV Simpósio Latinoamericano de Fisiología Vegetal Lima, Peru - Programas y Resúmenes 44-45.
- BRIX, H. 1962. The effect of water stress on the rates of photosynthesis and respiration in tomato plants and loblolly pine seedlings. *Physiol. Plant.* 15 : 10-20.
- BROWN, K.W.; JORDAN, W.R. e THOMAS, J.C. 1976. Water stress indu

ced alterations of the stomatal response to decreases in leaf water potential. *Physiol. Plant.* 37: 1-5.

CANVIN, D.T. e ATKINS, C.A. 1974. Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves, effect of light, carbon dioxide and oxygen. *Planta* 116: 207-224.

CARLSON, R.E.; MOMEN, N.N.; ARJMAND, O. e SHAW, R.H. 1979. Leaf conductance and leaf water potential relationships for two soybean cultivars grown under controlled irrigation. *Agron. J.* 716: 321-325.

CARVAJAL, J.F. e CAVALLINI, J.A. 1972. Nitrate reductase activity in coffee trees as affected by mineral deficiency. American Society of Agronomy Annual Meeting - Miami-U.S.A. (abstract)

CARVALHO, A. 1939. Causas da baixa produtividade do *C. arabica* L. var. maragogipe Hort ex Froehner. Boletim Técnico nº59 Instituto Agronomico do Estado - Campinas 14p

CARVALHO, A. e MONACO, L.C. 1972. Transferência do fator catur

ra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica*. *Bragantia* 31 (31) : 379-399.

CARVALHO, A.; KRUG, C.A.; MENDES, J.E.T.; ANTUNES FILHO, H; MO
RAIS, H.; ALOISI SOBRINHO, J; MORAIS, V.M. e ROCHA, T. R.
1952. Melhoramento do cafeeiro IV - Café Mundo Novo. *Bra-*
gantia 12: 97-129.

CARVALHO, A.; SCARANARI, H.J.; ANTUNES FILHO, H. e MONACO, L.
C. 1961. Melhoramento do cafeeiro XXII - Resultados obti-
dos no ensaio de seleções regionais de Campinas. *Bragan-*
tia 20 (30) : 711-740.

CARVALHO, A.; MONACO, L.C. e CAMPANA, M.P. 1964. Melhoramento
do cafeeiro XXVII - Ensaio de Seleções Regionais de Jaú.
Bragantia 23 (13): 129-142.

CAVALLINI, J.A. e CARVAJAL, J.F. 1978. Mineral nutrition and
nitrate reductase activity in coffee trees affected by
mineral deficiency. *Turrialba* 28 (1) : 61-66.

CLOUGH, B.F. e MILTHORPE, F.L. 1975. Effects of water deficit

on leaf development in tobacco. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:
291-300.

CUTLER, J.M.; RAINS, D.W. 1977. Effects of irrigation history
on responses of cotton to subsequent water stress. *Crop
Sci.* 17: 319-335.

DAVIES, W.J. 1977. Stomatal responses to water stress and light
in plants grown in controlled environments and in the field.
Crop Sci. 17: 735-740.

DHINDSA, R.S. e CLELAND, R.E. 1975. Water stress and protein
synthesis. *Plant Physiol.* 55: 778-781.

EHRET, D.L. e BOYER, J.S. 1979. Potassium loss from stomatal
guard cells at low water potentials. *J. Exp. Bot.* 130 (115) :
225-234.

FALEIROS, R.S.; MELO, W.J.; CARVALHO, F. e MIRANDA NETO, A. T .
1975. Atividade do nitrato redutase e desenvolvimento de
mudas de *Coffea arabica* L. (Café) *Científica* 3 (2): 277 -
283.

- FILNER, P. 1966 - Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 118: 299-310.
- FLOWERS, T.J. e HANSON, J.B. 1969. The effect of reduced water potential on soybean mitochondria. *Plant Physiol.* 44:939-945.
- FRANCO, C.M. 1938. Sobre a fisiologia dos estomas do cafeeiro *Coffea arabica* L. An. 1.^a Reun. SulAmer. Bot. Vol III : 293-302.
- FRANCO, C.M. e INFORZATO, R. 1950. Quantidade de água transpirada pelo cafeeiro cultivado ao sol. *Bragantia* 10 (9):247-257.
- FRANCO, C.M. e MAGALHÃES, A.C. 1965. Techniques for the measurements of transpiration of individual plants. International Symposium on the Methodology of Plant, Eco-Physiology, UNESCO, Montpellier, France.
- FRANK, A.B.; POWER, J.F. e WILLIS, W.O. 1973. Effect of temperature and plant water stress on photosynthesis, diffusion

resistance and leaf water potential in Spring wheat.

Agron. J. 65: 777-780.

GAASTRA, P. 1959. Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature and stomatal diffusion, resistance. *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 59: 1-68.

GIVAN, C.F.; GIVAN, A. e LEECH, R.M. 1970. Photoreduction of alpha-ketoglutarate to glutamate by *Vicia faba* chloroplasts *Plant Physiol.* 45: 624-630.

HAGEMAN, R. H. e FLESHER, D. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiol.* 35: 700-708.

HAGEMAN, R. H.; FLESHER, D. e GILTER, A. 1961. Diurnal variation and other light effects influencing the activity of nitrate reductase and nitrogen metabolism in corn. *Crop Sci.* 1:201-204.

HANSON, A.D.; NILSEN, C.E. e EVERSON, E.H. 1977. Evaluation of

free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop Sci.* 17: 720 - 726.

HARPER, J.E. e HAGEMAN, R.H. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L.Merr.). *Plant Physiol.* 49: 146-154.

HEARTHERLY, L.G.; RUSSELL, W.J. e HINCKLEY, T.M. 1977. Water relations and growth of soybeans in drying soil. *Crop Sci.* 17: 381-386.

HEIMER, V.R. e RICKLIS, E. 1979. Post transcriptional control of nitrate reductase of cultured tobacco cells by aminoacids. *Plant. Physiol.* 64: 663-664.

HENZELL, R.G.; MCCREE, K.J.; VAN BAVEL, C.H.M. e SCHERTZ, K.F. 1975. Method for screening sorghum genotype for stomatal sensitivity to water deficits. *Crop Sci.* 15: 516-518.

HENZELL, R.G.; MCCREE, K.J.; VAN BAVEL, C.H.M. e SCHERTZ, K.F. 1976. Sorghum genotype variation in stomatal sensitivity to

- leaf water deficit. *Crop Sci.* 16:660-662.
- HEUER, B.; PLAUT, Z. e FEDERMAN, E. 1979. Nitrate and nitrite reduction in wheat leaves as affected by different types of water stress. *Physiol. Plant.* 46: 318-323.
- HEWITT, E.J. 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 26: 73-100.
- HSIAO, T.C. 1970. Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress. *Plant Physiol.* 46 : 281-285.
- HSIAO, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 519-570.
- HSIAO, T.C. e ACEVEDO, E. 1974. Plant Responses to water deficits, water-use efficiency and drought resistance. *Agric. Meteorol.* 14: 59-84.
- HSIAO, T.C.; ACEVEDO, E. e HENDERSON, D.W. 1970. Maize leaf elongation: continuous measurements and close dependence on plant water status. *Science* 168: 590-591.

HUFFAKER, R.C.; RADIN, T.; KLEINKOPF, G.E. e COX, E.L. 1970.

Effects of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. *Crop Sci.* 10: 471-473.

HUSAIN, I. e ASPINALL, D. 1970. Water stress and apical morphogenesis in barley. *Ann. Bot. (LONDON) (N.S.)* 34: 393-407.

JAWORSKI, E.G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1274-1279.

JOHNSON, R.R.; FREY, N.M. e MOSS, D.N. 1974. Effect of water stress on photosynthesis and transpiration of flag leaves and spikes of barley and wheat. *Crop. Sci.* 14: 728-731.

JONES, H.G. 1973. Moderate-term water stresses and associated changes in some photosynthetic parameters in cotton. *New Phytol.* 72. 1095-1105.

JONES, R.W. e SHEARD, R.W. 1977. Conditions affecting in vivo nitrate reductase activity in chlorophyllous tissues. *Can.*

J. Bot. 55: 896-901.

JORDAN, W.R. e HUFFAKER, R.C. 1972. Influence of age and light on the distribution and development of nitrate reductase in greening barley leaves. *Physiol. Plant.* 26: 296-301.

JORDAN, W.R. e RITCHIE, J.T. 1971. Influence of soil water stress on evaporation, root absorption, and internal water status of cotton. *Plant Physiol.* 48:783-788.

KAUL, R. 1966. Effect of water stress on respiration by wheat. *Can. J. Bot.* 44: 623-632.

KANNANGARA, C.G. e WOOLHOUSE, H.W. 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.

KECK, R.W. e BOYER, J.S. 1974. Chloroplast response to low water potentials III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation. *Plant Physiol.* 53: 474-479.

- KIRKHAM, M.B.; GARDNER, W.R. e GERLOFF, G.C. 1972. Regulation of cell division and cell enlargement by turgor pressure. *Plant Physiol.* 49: 961-962.
- KLAR, A.E.; USBERTI JR, J.A. e HENDERSON, D.W. 1978. Differential responses of guinea grass populations to drought stress. *Crop Sci.* 18. 853-857.
- KLEPPER, L.; FLESHER, D.F. e HAGEMAN, R.H. 1971. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves *Plant Physiol.* 48: 580-590.
- KOEPPE, D.E.; MILLER, R.J. e BELL, D.T. 1973. Drought affected mitochondrial processes as related to tissue and whole plant responses. *Agron. J.* 65: 566-569.
- KRAMER, P.J. 1969. Plant and soil water relationships. McGraw-Hill Book Co. New York.
- KRUG, C.A. 1949. Mutações em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 9 (1-4) 1-10.

- KRUG, C.A. e CARVALHO, A. 1942. Genética de *Coffea* VII. Hereditariedade dos caracteres de *Coffea arabica* L. maragogipe Hort ex Froehner *Bragantia* 2: 231-247.
- KRUG, C.A.; MENDES, J.E.T. e CARVALHO, A. 1939. Taxonomia de *Coffea arabica* L. Descrição das variedades e formas encontradas no Estado de S.Paulo. *Boletim Técnico nº 62*. Instituto Agronomico do Estado, Campinas - 54p.
- KRUG, C.A.; CARVALHO, A. e ANTUNES FILHO, H. 1955. Genética de *Coffea* XVII Herança do característico *angustifolia* em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 24(8):71-85.
- LAWLOR, D.W. 1976. Water stress induced changes in photosynthesis, photorespiration, respiration and CO₂ compensation concentration of wheat. *Photosynthetica* 10 (4):378-387.
- LAWLOR, D.W. e FOCK, H. 1978. Photosynthesis, respiration and carbon assimilation in water stressed maize at two oxygen concentrations. *J.Ex.Bot.*29: 579-593.
- LIPS, S.H. e ROTH-BEJERANO, N. 1969. Light and hormones: inter

changeability in the induction of nitrate reductase. *Sci. N. Y.* 66:109.

LOVEYS, B.R. e KRIEDEMANN, P.E. 1973. Rapid changes in abscisic acid-like inhibitors following alterations in vine leaf water potential. *Physiol. Plant.* 28: 476-479.

LUDLOW, M.M. e NG, T.T. 1976. Effect of water deficit on carbon dioxide exchange and leaf elongation rate of *Panicum maximum* var *trichoglume* *Aust. J. Plant Physiol.* 3: 401-403.

MAESTRI, M. e VIEIRA, C. 1958. Movimento de estômatos em café, sob condições naturais. *Rev. Ceres* 10:324-331.

MAGALHÃES, A.C. 1973. Nitrogen metabolism in soybean plants under conditions of temperature stress. Tese de Ph. D. University of Illinois, Urbana-Champaign.

MAGALHÃES, A.C. 1975. Nitrate assimilation in higher plants. *What's New in Plant Physiology* 7: 1-5.

MAGALHÃES, A.C. 1976. Carbon dioxide effects on nitrate reductio

on in soybeans leaves. *Ciência e Cultura (São Paulo)* 28:
785-787.

MAGALHÃES, A.C.; NEYRA, C.A. e HAGEMAN, R.H. 1974. Nitrite as
similation and amino nitrogen synthesis in isolated spi-
nach chloroplasts. *Plant Physiol.* 53: 411-415.

MALI, P.C. e MENTA, S.L. 1977. Effect of drought on enzymes
and free proline in rice varieties. *Phytochemistry* 16:
1355-1357.

MARANVILLE, J.W. e PAULSEN, G.M. 1972. Alteration of protein
composition of corn (*Zea mays*) seedlings during moisture
stress *Crop Sci.* 12: 660-663.

MATTAS, R.E. e PAULI, A.W. 1965. Trends in nitrate reduction
and nitrogen fractions in young corn (*Zea mays* L.) plants
during heat and moisture stress. *Crop Sci.* 5: 181-184.

MEDERSKI, H.J.; CHEN, L.H. e CURRY, R.B. 1975. Effect of leaf
water deficit on stomatal and nostomatal regulation of
net carbon dioxide assimilation. *Plant Physiol.* 55: 589-593.

- MEYER, R.F. e BOYER, J.S. 1972. Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* 108: 77-87.
- MCCREE, K.J. 1974. Changes in stomatal response characteristics of grain in sorghum produced by water stress during growth *Crop Sci.* 14:273-278.
- MCCREE, K.J, e DAVIS, S.D. 1974. Effect of water stress and temperature on leaf size and number of epidermal cells in grain sorghum *Crop.Sci.* 14:751-755.
- MIFLIN, B.J. e LEA, P.J. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem.* 15: 873-885.
- MILLAR, B.D. e DENMEAD, O.T. 1976. Water relations of wheat leaves in the field. *Agron. J.* 68: 303-307.
- MILLER, R.J.; BELL, D.T. e KOEPPE, D.E. 1971. The effects of water stress on some membrane characteristic of corn mitochondria. *Plant Physiol.* 48: 229-231.

- MONACO, L.C.; CARVALHO, A. e ROCHA, T.R. 1865. Melhoramento do cafeeiro XXVIII - Ensaio de Seleções regionais em Mococa. *Bragantia* 24 (2): 9-27.
- MORILLA, C.A.; BOYER, J.S. e HAGEMAN, R.H. 1973. Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (*Zea mays* L.) having low leaf water potentials. *Plant Physiol.* 51 : 817-824.
- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E. e 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. 1970. Resistência à secura em *Coffea arabica* II. Estudo comparativo das seleções KP, K₇ e Harrar. *Garcia de Orla (Lisboa)*. 18: 125-130.
- NUNES, M.A. 1974. Resistência à secura em *Coffea arabica* L. III Estudo Comparativo das seleções S795, Geisha, S4 Agaro e Caterra. *Portg. Acta Biolog.* (A) III (1-2): 143-156.
- NUNES, M.A. e DUARTE, N.T. 1969. Resistência à secura em *Coffea*

arabica. Estudo comparativo de duas seleções. *Garcia de Orta (Lisboa)*. 17 : 83-96.

NUTMAN, F.J. 1937. Studies on the physiology of *Coffea arabica* II. Stomatal movements in relation to photosynthesis under natural conditions. *Ann. Bot. (London) (N.S.)* 1: 681-693.

NUTMAN, F.J. 1941. Studies of the physiology of *Coffea arabica* III. Transpiration rates of whole trees in relation to natural environmental conditions. *Ann. Bot. (London) (N.S.)* V (17): 59-82.

ONWUEME, I.C., LAUDE, H.M. e HUFFAKER, R.C. 1971. Nitrate reductase activity in relation to heat stress in barley seedlings *Crop Sci.* 11: 195-200.

ORTOLANI, A.A.; SILVEIRA PINTO, H.; PEREIRA, A.R. e ALFONSI, R. R. 1970. Parâmetros climáticos e a cafeicultura. Rio de Janeiro - Instituto Brasileiro do Café. 27p.

O'TOOLE, J.C.; OZBUN, J.L. e WALLACE, D.H. 1977. Photosynthetic response to water status in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant* 40: 111-114.

PLAUT, Z. 1971. Inhibition of photosynthetic carbon dioxide fixation in isolated spinach chloroplasts exposed to reduced osmotic potentials. *Plant Physiol.* 48: 591-595.

PLAUT, Z. 1973. The effect of soil moisture tension and nitrogen supply on nitrate reduction and accumulation in wheat seedlings *Plant and Soil* 38: 81-94.

PLAUT, Z. 1974. Nitrate reductase activity of wheat seedlings during exposure to and recovery from water stress and salinity. *Physiol. Plant.* 30: 212-217.

POTTER, J.R. e BOYER, J.S. 1973. Chloroplast response to low leaf water potentials II. Role of osmotic potential. *Plant Physiol.* 51: 993-997.

PURVIS, A.C.; PETERS, D.B. e HAGEMAN, R.H. 1974. Effect of carbon dioxide on nitrate accumulation and nitrate reductase induction in corn seedlings. *Plant Physiol.* 53: 934-941.

RADHAMOHANRAO, M.; TEARE, I.D.; POWERS, W.L. e SKIDMORE, E.L. 1977. Nitrate reductase activity of soybean in relation to

other indicators of water stress - *Phyton* 35 (2): 189-194.

RADIN, J.W. 1973. In vivo assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. Effect of oxygen and ammonium. *Plant Physiol.* 51: 332-336.

RAJAGOPAL, V.; BALASUBRAMANIAN, V. e SINHA, S.L. 1977. Diurnal fluctuations in relative water content nitrate reductase and proline content in water-stressed and non-stressed wheat. *Physiol. Plant.* 40: 69-71.

RHODES, P.R. e MATSUDA, K. 1976. Water stress, rapid polyribosome reductions and growth. *Plant Physiol.* 58: 631-635.

RITENOUR, G. e HUFFAKER, R.C. 1964. The effect of light, nitrogen nutrition and temperature on the nitrate reductase activity of barley seedlings. *Plant Physiol.* 39 (Supp): XX-XXL.

ROARK, B.; QUISENBERRY, J.E. 1977. Environmental and genetic components of stomatal behavior in two genotypes of upland cotton *Plant Physiol.* 59: 354-356.

- ROUTLEY, D.G. 1966. Proline accumulation in wilted Ladinoclover leaves *Crop Sci.* 6: 358-361.
- SCHNEIDER, W.G. e CHILDERS, N.F. 1941. Influence of soil moisture on photosynthesis, respiration and transpiration of apple leaves. *Plant Physiol.* 6: 565-583.
- SHANER, D.L. e BOYER, J.S. 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.* 58: 505-509.
- SHAH, C.B. e LOOMIS, R.S. 1965. Ridonucleic acid and protein metabolism in sugar beet during drought. *Physiol. Plant.* 18: 240-254.
- SINGH, T.N.; PALEG, L.G. e ASPINALL, D. 1973a. Stress metabolism I. Nitrogen metabolism and growth in the barley during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 45-56.
- SINGH, T.N.; ASPINALL, D; PALEG, L.G. e BOGGESS, S.F. 1973b. Stress metabolism II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 57-63.

- SIONIT, N. e KRAMER, P.J. 1977. Effect of water stress during stages of growth of soybean. *Agron. J.* 69: 274-278.
- SIVAKUMAR, M.V.K. e SHAW, R.H. 1978a. Leaf response to water deficits in soybeans. *Physiol. Plant.* 42: 134-138.
- SIVAKUMAR, M.V.K. e SHAW, R.H. 1978b. Relative evaluation of water stress indicators for soybeans. *Agron. J.* 70:619-623.
- SRIVASTAVA, H.S. 1975. Distribution of nitrate reductase in ageing bean seedlings. *Plant e Cell Physiol.* 16: 995-999.
- STEWART, G. R. 1972. The regulation of nitrite reductase level in *Lemna minor* L. *J. Exp. Bot.* 23: 171-183.
- STOUT, D.G.; KANNANGARA, T. e SIMPSON, G.M. 1978. Drought resistance of sorghum bicolor. 2 - Water stress effects on growth *Can. J. Plant. Sci.* 58: 225-233.
- STULEN, I.; KOCH-BOSMA, T. e KOSTER, A. 1973. The influence of light and nitrate on the induction of nitrate reductase in dark grown seedlings of *Raphanus sativus*. *Acta Bot. Neerl.* 22: 581-588.

- TERRY, N. ; WALDRON, L.J. e ULRICH, A. 1971. Effects of moisture stress on the multiplication and expansion of cells in leaves of sugar beet. *Planta (BERL)* 97: 281-289.
- TESHA, A.J. e KUMAR, D. 1978. Effect of fertilizer nitrogen on resistance in *Coffea arabica* L. *J.Agric.Sci.Camb.* 90:625-631
- TINGEY, D.T.; FITES, R.C. e BAHARSJAH, J. 1974. Factors influencing nitrate reduction in soybean foliage. *New Phytol.* 73 : 21-29.
- TODD, G.W. 1972. Water deficits and enzymatic activity. Em: Water deficit and plant growth. vol III T.T. KOZLOWSKI (editor) Academic Press, New York.
- TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. e KEY, J.L.1970. Light induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves. *Plant Physiol.* 46: 800-805.
- TRAVIS, R.L.; JORDAN, W.R. e HUFFAKER, R.C. 1970. Light and nitrate requirement for induction of nitrate reductase activity in *Hordeum vulgare*. *Plant Physiol* 23: 678-685.

- TROUGHTON, J.H. 1969. Plant Water status and carbon dioxide exchange of cotton leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 289-302.
- TSUKAMOTO, A. 1970. Reductive carboxylation and amination of ketoacids by spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 11 : 221-230.
- TURNER, N.C. 1974. Stomatal behavior and water status of maize, sorghum and tobacco under field conditions. II At low soil water potential. *Plant Physiol.* 53: 360-365.
- TURNER, N.C.; BEGG, J.E. e LORRAINE TONNET, M. 1978. Osmotic adjustment of sorghum and sunflower crops in response to water deficits and its influence on the water potential at which stomata close. *Aust. J. Plant Physiol.* 5: 597-608.
- TYMMS, M.J. e GAFF, D.F. 1979. Proline accumulation during water stress in resurrection plants. *J.Exp.Bot.* 30: 165-168
- UPCHURCH, R.P. ; PETERSON, M.L. e HAGAN, R.M. 1955. Effect of soil moisture content on the rate of photosynthesis and

respiration in ladino clover (*Trifolium repens* L.) *Plant Physiol* 30: 297-303

VAADIA, Y. e WAISEL, Y. 1967. Physiological processes as affected by water balance. Em: R.M. Hagan. H.R. Haise and T.W. Edminster (eds). Irrigation of agricultural lands. Am.Soc. Agron. Madison. Wis.

VAADIA, Y. ; RONEY, F.C. e HAGAN, R.M. 1961. Plant water deficits and physiological processes. *Ann. Rev. Plant Physiol* 12 : 265-292.

VIEIRA DA SILVA, J.B.; BAPTISTA, J.E., e NUNES, M.A. 1960. In - fluência do teor de humidade do solo sobre a transpiração das plantas e aplicação do método dos papéis de cloreto de cobalto à medição da transpiração no cafeeiro. Primeira Reunião Técnica FAO/CCTA sobre a produção e proteção do cafeeiro. Abidjan Costa do Marfim.

WALDREN, R.P. e TEARE, I.D. 1974. Free proline accumulation in drought-stressed plants under laboratory conditions. *Plant and Soil* 40: 689-692.

- WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. e EHLER, S.W. 1974. Changes in free proline concentration in sorghum and soybean plants under field conditions. *Crop Sci.* 14: 447-450.
- WALLACE, W. e PATE, J.S. 1965. Nitrate reductase in field pea (*Pisum arvensis* L.) *Ann. Bot.* 29:655-671
- WALTON, D.C.; GALSON, E. e HARRISON, M.A. 1977. The relationship between stomatal resistance and abscisic acid levels in leaves of water-stressed bean plants. *Planta* 133: 145-148.
- WORMER, T.M. 1965. The effect of soil moisture, nitrogen fertilization and some meteorological factors on stomatal aperture of *Coffea arabica* L. *Ann. Bot. (N.S.)* 29: (116): 523-539
- WEST, D.W. e GAFF, D.F. 1976. The effect of leaf water potential leaf temperature and light intensity on leaf diffusion resistance and the transpiration of leaves of *Malus sylvestris* *Physiol. Plant.* 38: 98-104.
- WRIGHT, S.T.C. 1969. An increase in the 'inhibitor β ' content of detached wheat leaves following a period of wilting. *Plan-*

ta 86 10-20.

WRIGHT, S. .C. 1977. The relationship between leaf water potential (Ψ leaf) and the levels of abscisic acid and ethylene in excised wheat leaves. *Planta* 134: 183-189.

ZABADAL, J. 1974. A water potential threshold for the increase of ~~ab~~scisic acid in leaves. *Plant Physiol.* 53: 125-127.