

ATIVIDADE DA REDUCTASE DO NITRATO EM MILHO (*Zea mays* L. var. 'PIRANÃO') EM NÍVEIS CRESCENTES DE NITROGÊNIO*

Carlos Alberto Vasconcellos
José Maurício Fortes
Newton Pereira Stamford
José Fernandes
Zorilda Gomes dos Santos**
Eurípedes Malavolta***

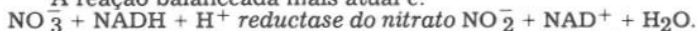
1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos macronutrientes de importância fundamental nos componentes orgânicos das plantas: aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, coenzimas, pigmentos clorofilados, hormônios, etc., e constitui, aproximadamente, 3% do peso da matéria seca do vegetal (3, 10, 14).

Ao utilizarem o NO_3 como fonte de nitrogênio, as plantas superiores e os microrganismos precisam reduzi-lo ao nível de valência NH_3 . Há considerável número de informações sobre os passos intermediários desse processo de redução, sendo a primeira etapa, redução do NO_3 a NO_2 , efetuada pela enzima reductase do nitrato (2, 5 e outros).

As enzimas reductase do nitrato são flavoproteínas que requerem FAD (Dinucleotídeo de Flavina e Adenina), Mo e Fe como cofatores, os quais sofrem oxirredução durante a reação (5, 14). Essas características, que em literatura nem sempre concordam, são resumidas por BEEVERS e HAGEMAN (2) e apresentadas por MALAVOLTA *et alii* (14).

A reação balanceada mais atual é:



Nem sempre há paralelismo entre o teor de nitrogênio total e a produtividade das plantas, e uma das maiores limitações é a impossibilidade de distinção entre a forma de nitrogênio bioquimicamente ativa e a relativamente inativa (1).

Pela atividade da reductase do nitrato é muitas vezes possível avaliar o esta-

* Trabalho apresentado na disciplina «Nutrição Mineral de plantas» do curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de plantas, ESALQ/USP, Piracicaba, 1975. Com ajuda da CNEN, da FAPESP e do BNDE (contrato FUNDEC 293).

Recebido para publicação em 23-06-1977.

** Alunos Pós-Graduados do Curso de Solos e Nutrição de Plantas.

*** Professor Catedrático da ESALQ/USP e Professor da Disciplina «Nutrição Mineral de Plantas».

do nutricional da planta em relação ao nitrogênio e à disponibilidade do elemento no meio. Por outro lado, essa atividade enzimática é função do teor de NO_3 no meio, como demonstraram CANDELA *et alii* (4), TRAVIS e HUFFAKER (16) e WALLACE (17).

A importância da reductase do nitrato na produção vegetal está evidenciada em diversos trabalhos. Na cultura do trigo, por exemplo, EILRICH e HAGEMAN (9) observaram que, mantendo-se elevada a atividade enzimática durante a fase reprodutiva, o teor de proteína no grão aumenta e sua queda é prevenida, quando em alta produção. DECKARD *et alii* (7), entre outras conclusões, observaram haver alta correlação entre a reductase do nitrato, a produção de grãos e o teor de proteínas, quando a atividade enzimática foi estudada durante o estágio inicial de formação da espiga, em seis cultivares de milho.

Com relação à produção de grãos e ao teor de proteínas, salienta-se a observação de Warnes, citado por ECK e HAGEMAN (8), de que são caracteres genéticos e sujeitos a manipulação. Segundo tais autores, é possível medir a reductase do nitrato em estágio de «seedlings», o que favorece a seleção de variedades e híbridos.

A finalidade do presente trabalho é estudar a atividade da reductase do nitrato em folhas de milho (var. 'Piranão') cultivado em solução nutritiva, sob doses crescentes de nitrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido a partir de plântulas obtidas por meio de germinação em substrato de vermiculita (semeadura em 20/02/1975), cultivadas em solução nutritiva completa, de HOAGLAND e ARNON (11), diluída a 1/5 e arejada.

Vinte dias após a germinação, as plantinhas foram transferidas para vasos de 2,5 litros, que continham soluções nutritivas, preparadas conforme MALAVOLTA (13), correspondentes aos tratamentos: sem N, 10,5, 234,0 e 390,0 mg de N/litro, em duas repetições e sob arejamento contínuo.

Posteriormente, aos 35 dias de idade, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade para 20 litros. A partir daí, as soluções foram trocadas de 20 em 20 dias. Diariamente foi recolocada a água evapotranspirada, com adição de água destilada.

Para determinação da atividade da reductase do nitrato as coletas do material foram efetuadas aos 56 dias de idade da planta, sendo analisadas rodela do terço médio da folha +4 do milho (var. 'Piranão'). A metodologia usada foi baseada em MULDER *et alii* (15), cuja técnica foi esquematizada por MALAVOLTA (13).

Os tratamentos 1, 2 e 3 foram coletados aos 70 dias de idade, e os tratamentos 4 e 5 aos 95 dias.

Depois de retiradas dos respectivos recipientes, as plantas foram lavadas primeiro n'água corrente, depois n'água destilada, e ensacadas de acordo com as seguintes divisões: folhas superiores, folhas inferiores, caule, raízes, pendão, palha da espiga, sabugo, grãos e cabelos.

Posteriormente, os materiais foram deixados a secar em estufa a 65-70°C, obtendo-se o peso do material seco. As determinações de nitrogênio foram feitas apenas nas folhas, após digestão sulfúrica, conforme a metodologia apresentada por JOHNSON e ULRICH (12).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra um aumento da atividade da reductase do nitrato com crescentes adições de NO_3 ao meio. Esses resultados são concordantes com os obtidos por TRAVIS e HUFFAKER (16), na cultura do milho, por MULDER *et alii* (15), em hortaliças, e por EILRICH e HAGEMAN (9), em trigo.

O nível máximo de atividade enzimática foi observado quando em presença de 296,1 mg de N/litro de solução nutritiva. Nesta situação, havia uma atividade de 40,51 μg de N-NO_2 por grama de matéria verde (2,89 μmoles de N-NO_2 por grama de matéria verde). Este resultado, nas condições em que foi efetuado o trabalho, deve expressar o máximo genético da atividade enzimática do cultivar estudado.

CROY e HAGEMAN (6) observaram um máximo de atividade ao redor de 21

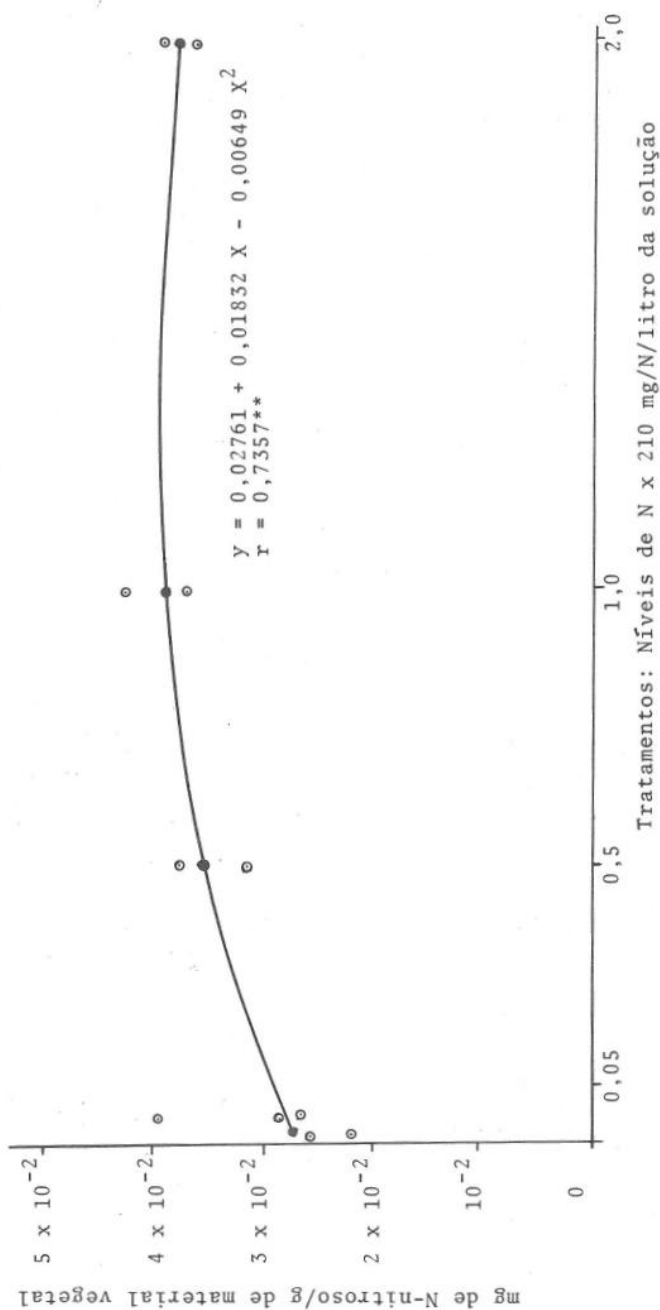


FIGURA 1 - Atividade da reductase do nitrato.
 ○ Valores observados.
 ● Valores esperados.

μ moles de KNO_2/g de matéria verde numa variedade de trigo. Em outras variedades, este máximo foi de 14μ moles de KNO_2/g de matéria verde, representando, respectivamente, 3.38μ moles de $\text{N-NO}_2/\text{g}$ de matéria verde.

Por meio dos dados apresentados na Figura 2 verifica-se um efeito linear entre os teores médios de N total, analisados nas folhas superiores e inferiores, e a reductase do nitrato. Desta forma, quanto maior for a atividade enzimática, maior será o teor de N total nas folhas, com regressão linear significativa ao nível de 5%. Neste ponto, vale ressaltar as observações de que, mantendo-se alta a atividade enzimática durante a fase reprodutiva, pode-se aumentar o teor de proteína no grão e prevenir sua queda, quando em alta produção.

Examinando a Figura 1 (reductase do nitrato) e a Figura 3 (teor de N total nas folhas), encontram-se diferentes pontos de máximo. Para a reductase do nitrato, este ponto foi obtido com 296.19 mg de N/litro de solução nutritiva. Observa-se valor semelhante correlacionado com o teor de N total nas folhas. O máximo para as folhas inferiores foi obtido com 305.50 mg de N/litro de solução e para as folhas superiores com 390.60 mg de N/litro.

A diferença entre as curvas obtidas para as folhas superiores e inferiores (Figura 3) pode ser explicada pela possível migração do nitrogênio, em consequência da alta mobilização do elemento para as partes mais novas da planta (14).

Por outro lado, analisando a produção total de matéria seca nos diversos tratamentos, em função dos níveis de N (Figura 4), observa-se um efeito linear significativo ao nível de 5%. Este efeito pode ser também verificado na Figura 5, com relação a peso de folhas superiores, colmo, pendão e raízes.

Houve também correlação positiva entre a produção total de matéria seca e a atividade da reductase do nitrato (Figura 6).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade da reductase do nitrato em milho (*Zea mays* L. var. 'Piranão') cultivado em solução nutritiva e sob doses crescentes de nitrogênio, na forma de NO_3^- .

A atividade da enzima foi analisada aos 56 dias de idade, em rodela de folhas do terço médio da folha +4, seguindo-se a metodologia proposta por MULDER *et alii* (15), adaptada por MALAVOLTA (13).

Os resultados permitiram concluir que o aumento do teor de NO_3^- no meio favoreceu a atividade da reductase do nitrato até o nível máximo de $40.51 \mu\text{g}$ de $\text{N-NO}_2/\text{g}$ de matéria verde, correspondente a um nível de 296.19 mg de N/litro de solução nutritiva.

Os resultados obtidos nas condições experimentais em que foi realizado o trabalho correspondem, provavelmente, ao máximo da capacidade genética da variedade estudada.

Os teores de N encontrados nas folhas inferiores foram mais baixos do que os das folhas superiores, em função da alta mobilização do elemento para as partes mais novas da planta.

Houve também correlação positiva entre a atividade da reductase do nitrato, o teor de N total da folha e a produção de matéria seca.

5. SUMMARY

A greenhouse experiment was carried out to measure effects of increasing amounts of nitrate-nitrogen on nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L. var. 'Piranão') grown in nutrient solution. Assays were made using leaf tissue collected 56 days after germination.

The following results were obtained:

a) Applied nitrate positively influenced dry matter production and nitrate reductase activity.

b) Higher levels of nitrate in the medium increased the nitrate reductase activity up to a level of $40.51 \mu\text{g}$ of nitrate/g dry weight, corresponding to a level of 296.19 mg of nitrogen in the nutrient solution.

c) Nitrogen content in the older leaves was lower than that found in the upper ones, presumably due to translocation of nitrogen into younger tissues.

d) There was a positive correlation between nitrate reductase activity with

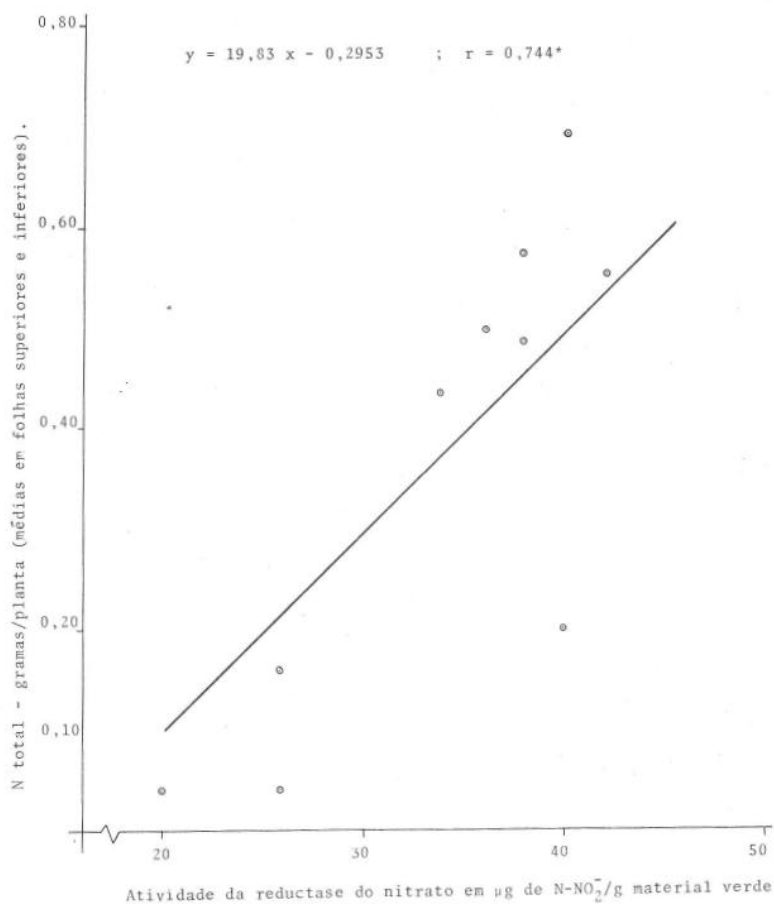


FIGURA 2 - Correlação entre o N total nas folhas e a atividade de reductase do nitrato.
 ○ - Pontos observados

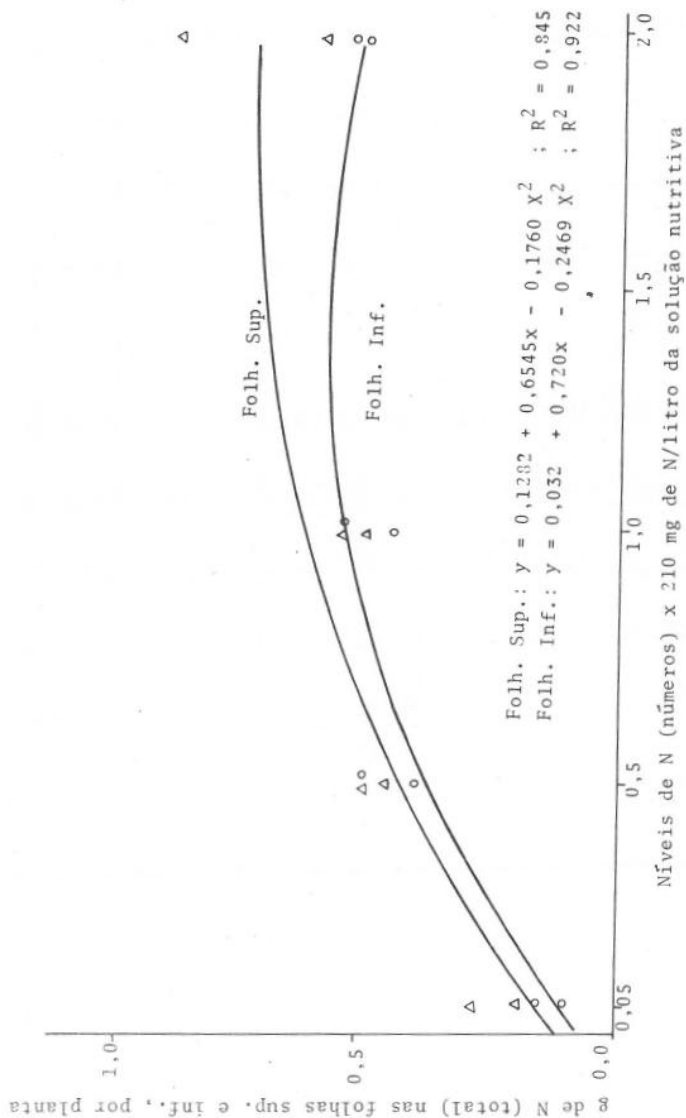


FIGURA 3 - Teores de N totais, analisados nas folhas superiores e inferiores, em função dos respectivos tratamentos.
 Δ valores observados em folhas superiores.
 ○ valores observados em folhas inferiores.

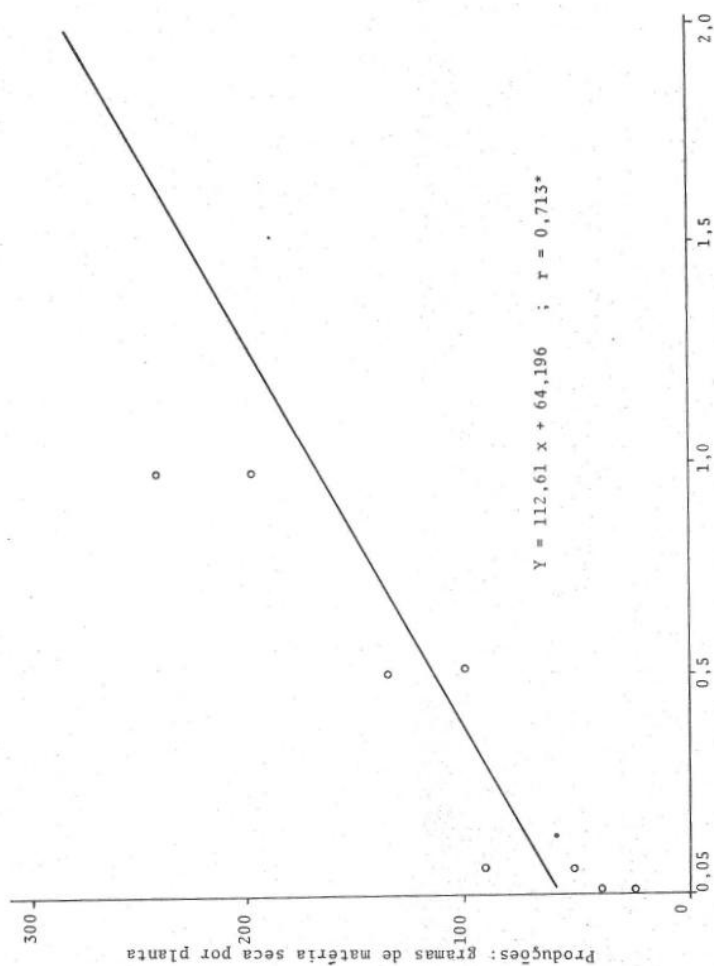


FIGURA 4 - Relação entre as produções obtidas (gramas de matéria seca total), em função dos níveis de $N-NO_3$.

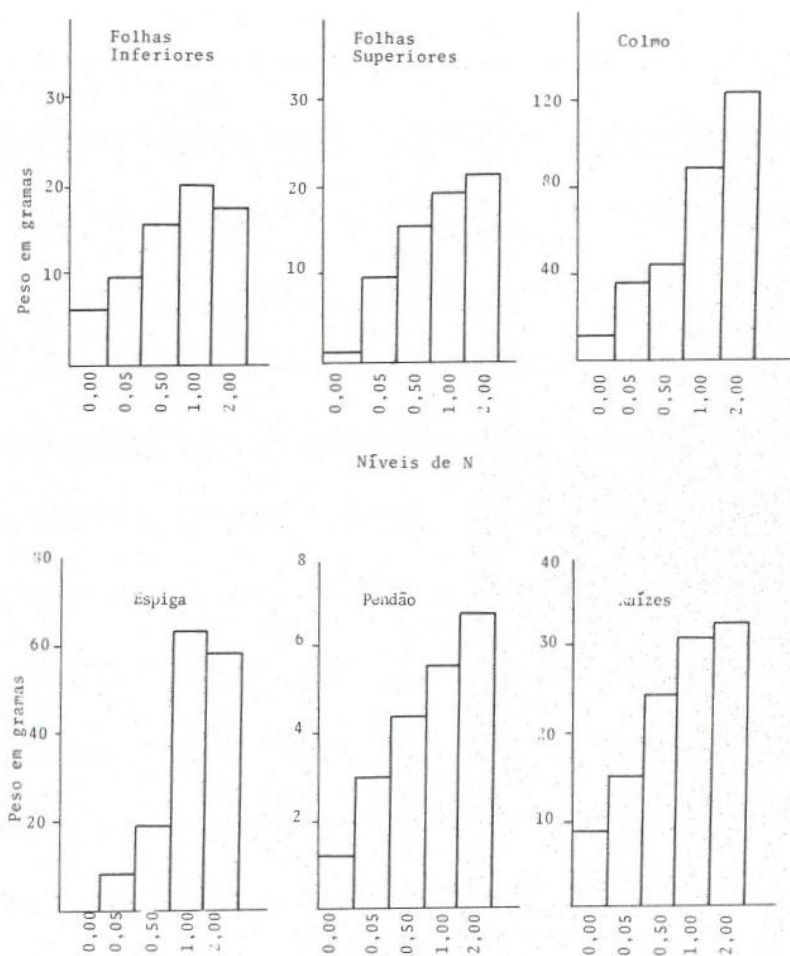


FIGURA 5 - Matéria seca das diferentes partes das plantas, em função dos níveis de $N-NO_3$.

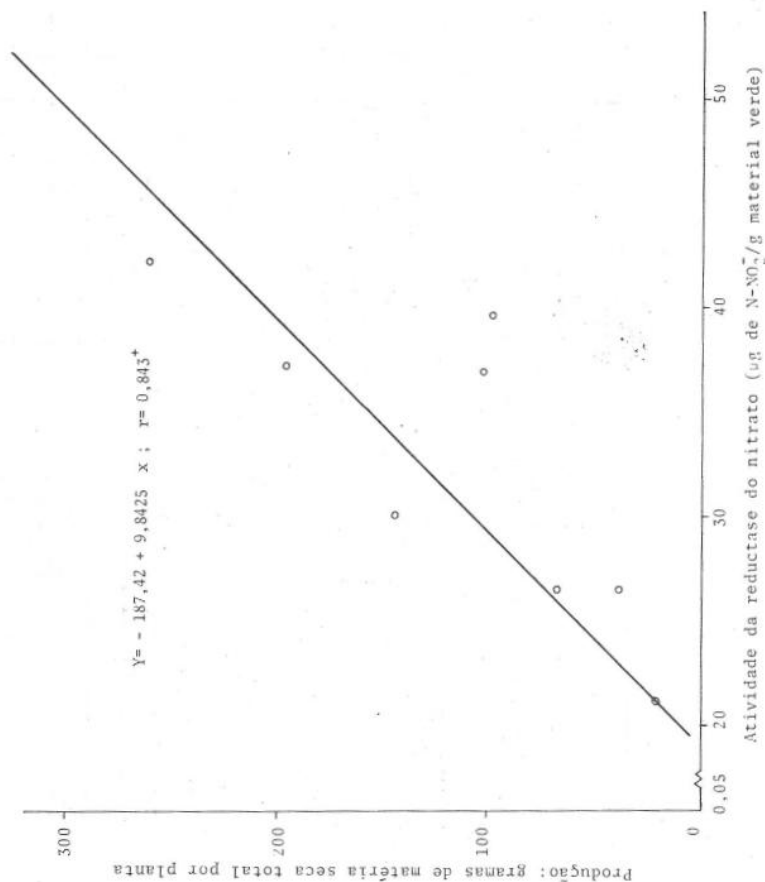


FIGURA 6 - Correlação entre a atividade da reductase do nitrato e matéria seca total.

nitrogen content in the leaves, and dry matter production.

6. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. BAR AKIVA, A. & STERNBAUM, J. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as source on the nitrogen requirement of citrus tree. *Plant Cell Physiol.* 6 (3): 575-577. 1965.
2. BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:495-522. 1969.
3. BLACK, C.A. *Soil plant relationships*. 2.^a ed. N. York, John Wiley and Sons Inc., 1969. 792 p.
4. CANDELA, M.I., FISCHER, E.G. & HEWITT, E.J. Molybdenum as a plant nutrient. X-Some factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plants grown with different nitrogen sources and molybdenum levels in sand culture. *Plant Physiol.* 32(4):280-288. 1957.
5. CONN, E.E. & STUMPF, P.K. *Introdução à Bioquímica*. Tradução MENOCCE, L., ALVES, J.M., JULIANO NETO, L., CÁCERES, O. e ALVAREZ, M.A. São Paulo, Edgard Blucher, 1975. 447 p.
6. CROY, L.I. & HAGEMAN, R.H. Relationships of nitrate reductase activity to grain protein production in wheat. *Crop Science* 10(3):280-285. 1970.
7. DECKARD, E.L., LAMBERT, R.J. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in corn leaves as related to yields of grain protein. *Crop Science* 13(3): 343-350. 1973.
8. ECK, H.V. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in sudan grass cultivars. *Crop Science* 4(2):283-287. 1974.
9. EILRICH, G.L. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity and its relationships to accumulation of vegetative and grain nitrogen in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Science* 13(1):59-66. 1973.
10. EPSTEIN, E. *Nutrição mineral das plantas — Princípios e perspectivas*. (Tradução e notas de MALAVOLTA, E.) São Paulo, Univ. S. Paulo, 1975. 341 p.
11. HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. Sta. Circ.* 347. 1950. 32 p.
12. JOHNSON, C.M. & ULRICH, A. Analytical methods. *Calif. Agric. Exp. Sta. Bull.* 766. 1959. 78 p.
13. MALAVOLTA, E. *Práticas de nutrição mineral de plantas*. Apostila do Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 1975. 65 p.
14. MALAVOLTA, E., HAAG, H.P., MELLO, F.A.F. & SOBRINHO, M.O.C.B. *Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas*. São Paulo, Ed. Pioneira, 1974. 752 p.
15. MULDER, E.G., BOSMA, R. & VAN VEEN, W.L. Nitrate reduction in plant tissue. *Plant and Soil* 10(4):335-355. 1959.
16. TRAVIS, R.L. & HUFFAKER, R.C. Light induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves. *Plant Physiol.* 46 (6):800-805. 1971.
17. WALLACE, W. The distribution and characteristics of nitrate reductase and glutamate dehydrogenase in the maize seedlings. *Plant Physiol.* 52(3):191-196. 1973.