

ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO EM *CAJANUS CAJAN* E *DESMODIUM BARBATUM* PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO ENSAIO¹

ADAUCTO BELLARMINO DE PEREIRA-NETTO²

RESUMO - Visando a recomendação de culturas de cobertura para plantios de seringueira localizados fora das áreas tradicionais de cultivo, padronizaram-se as condições do ensaio para a estimativa da atividade da redutase de nitrato (NR) em *Cajanus cajan* e *Desmodium barbatum*, tendo por objetivo sua posterior utilização como parâmetro indicativo do comportamento ecofisiológico destas espécies nas novas áreas de produção de borracha natural. Segmentos de folíolos de *C. cajan*, crescidos em casa de vegetação, e de *D. barbatum*, crescidos no campo, foram incubados em solução-tampão fosfato+KNO₃ e l-propanol, infiltrados sob vácuo, e transferidos para banho-maria sob agitação, na ausência de luz, para estimativa da atividade da NR *in vitro*, através de espectrofotometria a 540 nm. Foram realizados testes para determinação do tempo ótimo de incubação (entre 30 e 60 minutos, para as duas espécies) e maximização da atividade da enzima de acordo com o pH do tampão (8,0 para *C. cajan* e 7,5 para *D. barbatum*), a concentração do nitrato no meio de reação (200 mM para *C. cajan* e 100 mM para *D. barbatum*) e a temperatura de incubação (32°C para as duas leguminosas).

Termos para indexação: estresse hídrico, estresse térmico, assimilação de nitrato, ecofisiologia vegetal, cultura de cobertura.

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN *CAJANUS CAJAN* AND *DESMODIUM BARBATUM* ASSAY OPTIMIZATION

ABSTRACT - *Cajanus cajan* L. and *Desmodium barbatum* (L.) Berth have been largely used as soil cover species for rubber tree plantations in tropical regions. In order to recommend this leguminous as cover plants to rubber tree plantations located out of the traditionally cultivated areas, the *in vitro* nitrate reductase assay (NR) was optimized. The nitrate assimilation rates will be used as a physioecological parameter for *C. cajan* and *D. barbatum* growing in these new production areas. Leaf sections of *C. cajan* and *D. barbatum*, grown respectively in greenhouse and in the field, were incubated in phosphate buffer plus KNO₃ and l-propanol, infiltrated under vacuum and transferred to a shaking water bath, in the dark. NR activity was estimated based on nitrite dosage through spectrophotometry at 540 nm. The following conditions were determined: optimal incubation time for nitrite release readings (30-60 minutes, for both species), optimal buffer pH (8,0 for *C. cajan* and 7,5 for *D. barbatum*) and nitrate concentration (200 mM for *C. cajan* and 100 mM for *D. barbatum*) and incubation temperature (32°C for both leguminous) for maximum enzyme activity.

Index terms: water stress, thermic stress, nitrate assimilation, plant ecophysiology, soil cover species.

INTRODUÇÃO

No Brasil, tem-se verificado o deslocamento das áreas de produção de *Hevea brasiliensis*, tradicionalmente localizadas na região amazônica, para regiões onde é menor a incidência do

¹ Aceito para publicação em 10 de dezembro de 1991.
Trabalho realizado junto ao CEPAGRI/UNICAMP.

² Biol., Dep. de Biol., Univ. Estadual de Maringá, Caixa Postal 331, CEP 87020 Maringá, PR.

Microcyclus ulei, causador do "mal-das-folhas-da-seringueira". Nestas novas regiões de produção, a exemplo do Planalto Paulista, a menor disponibilidade de água e a menor temperatura do ar têm sido mencionadas como fatores limitantes para o estabelecimento de plantas comumente empregadas como cultura de cobertura nos plantios de seringueira.

A estimativa da atividade da redutase de nitrato (NR) tem sido utilizada, com sucesso, como parâmetro indicativo do comportamento fisiológico de plantas submetidas a condições edafoclimáticas adversas (Mattas & Pauli 1965, Plaut 1973 e Meguro & Magalhães 1983).

Neste trabalho, foram padronizadas as condições do ensaio para estimativa da atividade da NR *in vivo*, em *Cajanus cajan* e *Desmodium barbatum*, visando sua utilização como parâmetro indicativo do comportamento ecofisiológico destas leguminosas nas novas áreas de produção da seringueira.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste experimento foram utilizadas plantas de *Cajanus cajan* L. e de *Desmodium barbatum* (L.) Berth (Leguminosae: Faboideae), cultivadas em casa de vegetação, e no campo, respectivamente.

Condições de cultivo: *C. cajan*: Plantas provenientes de sementes foram cultivadas individualmente em vasos de plástico rígido, com capacidade de 2 litros, contendo vermiculita expandida. No dia anterior à amostragem, as plantas foram irrigadas com 80 ml de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), na qual o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ foi substituído por KH_2PO_4 (1mM). *D. barbatum*: plantas provenientes de propagação vegetativa, cultivadas em Latossolo Roxo há aproximadamente três anos, foram adubadas por cobertura com adubo químico granulado (N:P:K - 10.10.10) na razão de 50 g.m⁻².

Ensaio da redutase de nitrato: 30 dias após a semeadura, a primeira folha trifoliolada completamente expandida, no caso de *C. cajan*, e folíolos completamente expandidos recebendo radiação solar direta, no caso de *D. barbatum*, foram coletados cerca de quatro horas a partir do início do período de iluminação. Segmentos do tecido foliar foram incubados em solução-tampão fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$; 0,1M), contendo KNO_3 (0-200mM) e l-propanol 1% (v/v), e submetidos a infiltração sob vácuo, com posterior

transferência para banho-maria sob agitação e em ausência de luz. Alíquotas do extrato foram adicionadas a uma solução de N-2-naftiletlenodiamino di HCl 0,02% (m/v) + sulfanilamida 1% (m/v), HCl 1,5N H_2O (Snell & Snell 1949). Depois de estabilizada a reação, procedeu-se à dosagem do nitrito liberado pelo tecido através de espectrofotometria a 540 nm.

Foi avaliado o efeito do tempo de reação do ensaio sobre a liberação de nitrito pelo tecido, e também os efeitos do pH e da concentração de KNO_3 do meio de reação, e da temperatura de incubação do ensaio, sobre a atividade da redutase de nitrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do tempo de incubação do ensaio sobre a liberação de nitrito

O aumento no tempo de incubação do ensaio induziu aumento na quantidade de nitrito liberado pelo tecido nas duas leguminosas (Fig. 1).

Com base na redução das alterações na inclinação das retas determinadas por cada intervalo de tempo (15 minutos) ao longo do experimento, e na recomendação de não se estender a duração do ensaio além de 60 minutos (L'vov & Safaraliev 1988), admitiu-se o intervalo compreendido entre 30 e 60 minutos de incubação como o mais adequado para a retirada de alíquotas do extrato para dosagem do nitrito liberado.

Efeito do pH do meio de reação

A elevação do pH do meio de reação entre 6,0 e 8,0 provocou aumento na atividade da redutase de nitrato para as duas espécies consideradas (Fig. 2). Para *Coffea arabica* (Meguro & Magalhães 1982) e *Saccharum* sp. (Oliveira 1985), a atividade máxima da redutase de nitrato tem sido verificada em torno do pH 8,0.

Efeito da temperatura de incubação

O aumento na temperatura de incubação do ensaio de 22 para 32°C provocou crescimento na atividade da NR nas duas leguminosas (Fig. 3). Comportamento semelhante tem sido verificado para diferentes variedades de *Coffea*

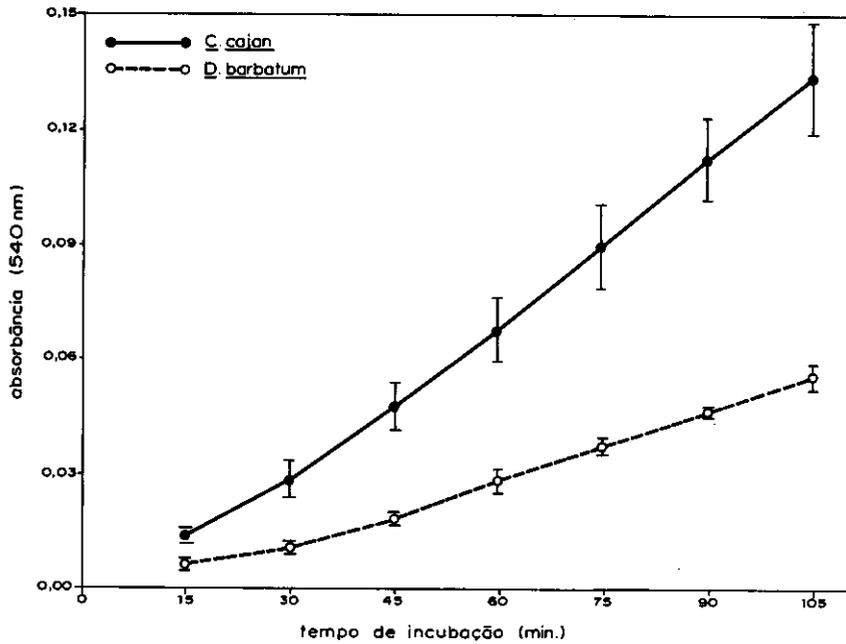


FIG. 1. Efeito do tempo de incubação do ensaio sobre a liberação do nitrito. Os dados representam um experimento repetido por três vezes. As barras verticais indicam o desvio-padrão. Temperatura de incubação = 32°C; pH e [KNO₃] do meio de reação = 6,5 e 50 mM, respectivamente.

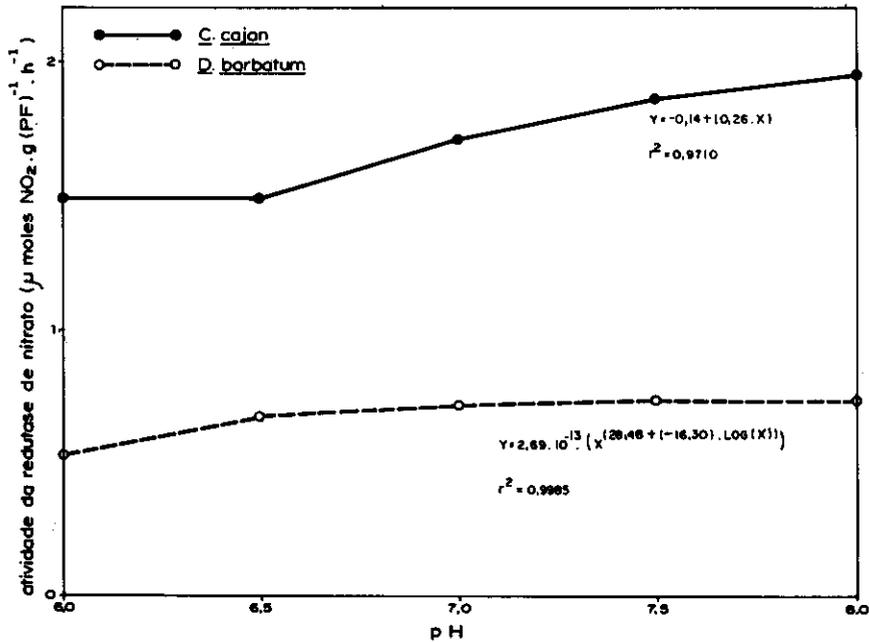


FIG. 2. Efeito do pH do meio de reação sobre a atividade da NR. Os dados representam um experimento repetido por três vezes. Temperatura de incubação = 32°C; [KNO₃] no meio de reação = 50 mM.

arabica (Meguro & Magalhães 1982 e Queiroz 1986).

Elevação na temperatura de 32 para 42°C provocou redução na atividade enzimática tanto em *D. barbatum* como em *C. cajan*, sendo que a temperatura de 42°C provocou grande diminuição na atividade da NR em *C. cajan* e redução menos acentuada em *D. barbatum*.

Efeito da concentração de nitrato no meio de reação

O aumento na concentração de nitrato no meio de reação de 0 para 100 mM induziu aumento na atividade da NR, para as duas leguminosas (Fig. 4).

A elevação na concentração de nitrato de 100 para 200 mM provocou aumento na atividade da enzima em *C. cajan*, e diminuição em *D. barbatum*.

A ausência de nitrato de potássio no meio de reação mostrou-se relacionada a níveis de atividade da NR próximos de zero, tanto em *D. barbatum* como em *C. cajan*. De acordo com Bevers & Hageman (1980), a redutase de nitrato é uma enzima induzida pelo substrato, normalmente só apresentando atividade na presença do nitrato. Assim, o comportamento da enzima pareceu indicar que a concentração de nitrato disponível no "pool" metabólico não era suficiente para ativação da enzima (Hallmark & Huffaker 1978).

AGRADECIMENTOS

Aos Agrônomos Olinto G. da Rocha Neto e Tatiana D. de Abreu Sá, pelo fornecimento de parte do material vegetal utilizado neste trabalho.

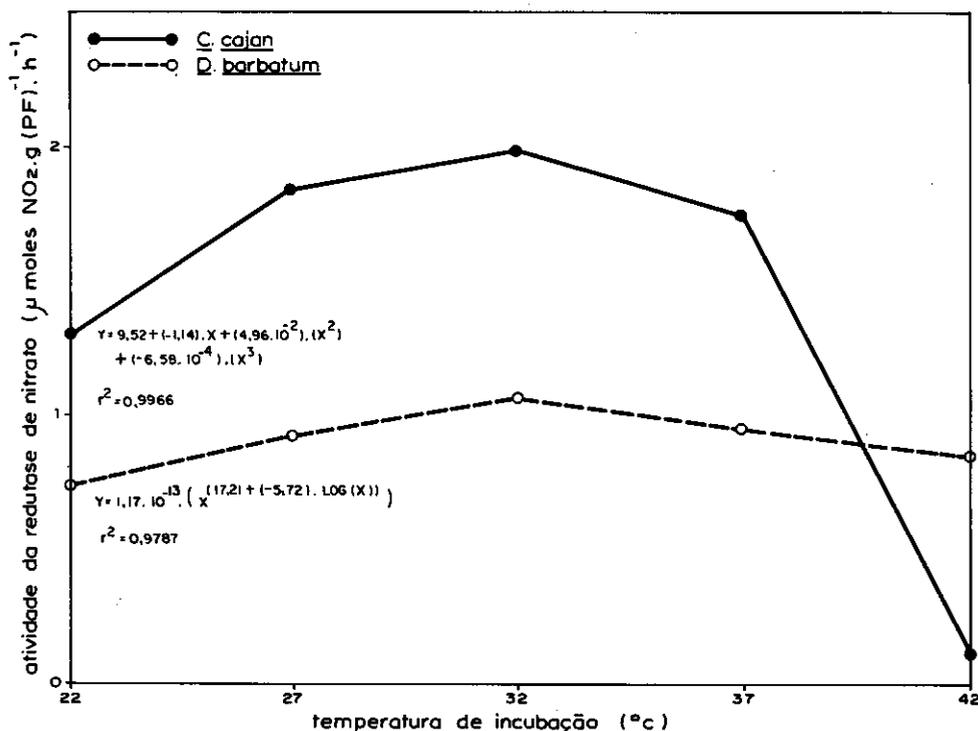


FIG. 3. Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da NR. Os dados representam um experimento repetido por três vezes. pH e $[KNO_3]$ do meio de reação = 7,5 (*C. cajan*) e 7,0 (*D. barbatum*), e 50 mM, respectivamente.

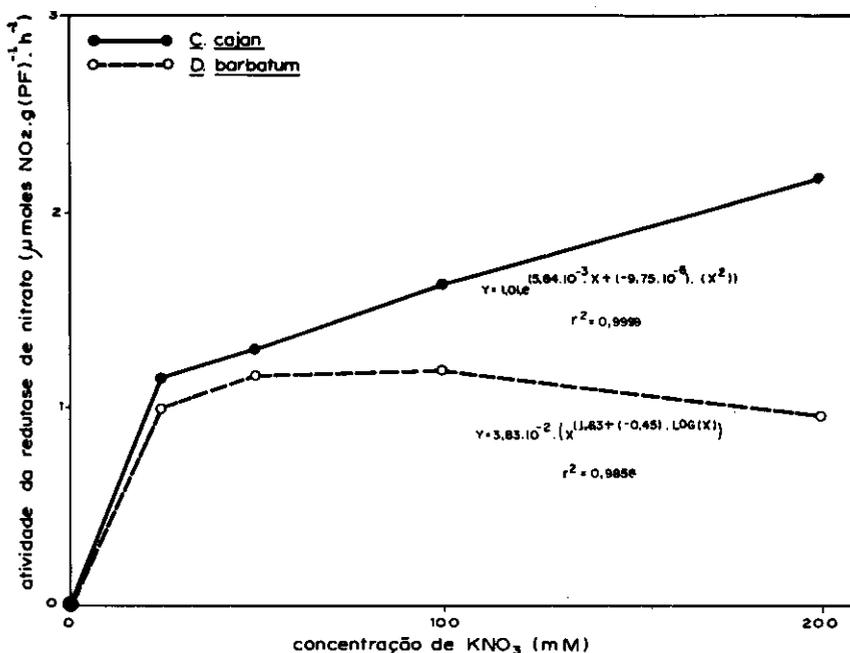


FIG. 4. Efeito da concentração de nitrato no meio de reação sobre a atividade da NR. Os dados representam um experimento repetido por três vezes. Temperatura de incubação = 32°C; pH do meio de reação = 7,5.

REFERÊNCIAS

BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate and nitrite reduction. In: MIFLIN, B.J. (Ed.). *The biochemistry of plants*. New York: Academic Press, 1980. v.5, p.115-168.

HALLMARK, W.B.; HUFFAKER, R.C. The influence of ambient nitrate, temperature, and light on nitrate assimilation in sudangrass seedlings. *Physiologia Plantarum*, v.44, p.147-152, 1978.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, n.347, 1950.

L'VOV, N.P.; SAFARALIEV, P.M. Methods of determining nitrate reductase activity in plants. *Soviet Plant Physiology*, v.35, p.154-157, 1988.

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

MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. Atividade da

redutase de nitrato em cultivares de café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.17, p.1725-1731, 1982.

MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. Water stress affecting nitrate reduction and leaf diffusive resistance in *Coffea arabica* L. cultivars. *Journal of Horticultural Science*, v.58, p.147-152, 1983.

OLIVEIRA, L.E.M. Comportamento fisiológico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) sob condições de deficiência hídrica: alteração da assimilação do nitrato e mobilização de açúcares. Campinas: UNICAMP, 1985. 126p. Tese de Doutorado.

PLAUT, Z. The effect of soil moisture tension and nitrogen supply on nitrate reduction and accumulation in wheat seedlings. *Plant and Soil*, v.38, p.81-84, 1973.

QUEIROZ, C.G. de S. Distribuição e regulação da redutase do nitrato no cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Viçosa, MG: UFV, 1986. Tese de Mestrado.

SNELL, F.D.; SNELL, C.T. *Colorimetric methods of analysis*. New York: Van Nostrand, 1949. p.804-805.