

REDUTASE DE NITRATO E SUA RELAÇÃO COM RENDIMENTO DE GRÃOS E
PROTEÍNA EM QUATRO CULTIVARES DE CEVADA (*Hordeum vulgare*, L.)

Nitrate Reductase And Its Relationship To Grain Protein And
Yields In Four Barley Cultivars

Cláudio Lovato*, Warren E. Kronstad** e Te May Ching**

RESUMO

Conduziu-se um experimento para observar a atividade da redutase de nitrato em resposta à adubação nitrogenada e sua relação com rendimento de grãos e proteína em quatro cultivares de cevada. A redutase de nitrato aumentou sua atividade com níveis crescentes de nitrogênio e também mostrou diferenças entre cultivares. Mostrou relação variável com nitrogênio na planta, produção de grãos por hectare, percentagem de proteína e quantidade total de proteína no grão. Em geral as relações mais elevadas ocorreram no florescimento e enchimento do grão.

O influxo diário de nitrogênio reduzido mostrou um grau mais elevado de associação com rendimento de grãos e proteínas do que a atividade da redutase de nitrato. Observaram-se diferenças em "eficiência enzimática" e "eficiência de transporte" entre os tratamentos.

Demonstrou-se que a atividade da redutase de nitrato ou o influxo teórico de nitrogênio reduzido foram os fatores que mais contribuíram para o rendimento de grãos e produção de proteína nos materiais estudados.

UNITERMOS: cevada, adubação nitrogenada, redutase de nitrato.

SUMMARY

An experiment was conducted to observe differences in nitrate reductase activity (NRA) in response to nitrogen fertilizer levels and its relationship to grain and grain protein production in four barley

* Engº Agrº, PhD, Prof. Adjunto do Departamento de Fitotecnia - Universidade Federal de Santa Maria - 97.119 - Santa Maria - RS.

**Professors of Crop Science - Oregon State University - OR - U.S.A.

cultivars. NRA increased with N fertilizer levels. Significant differences among cultivars were observed and showed varying degrees of association with nitrate nitrogen, grain production, percentage of grain protein and total grain protein production. In general the highest association was observed at stem elongation and flowering. Daily influx of reduced nitrogen had a higher degree of association with grain and grainprotein production than NRA. There were differences in "enzyme efficiency" and "transport efficiency" among treatments. It was demonstrated that nitrate reductase activity or daily input of reduced nitrogen and "transport efficiency" were the most important factors that contributed to grain and grain protein production.

KEY WORDS: barley, nitrogen fertilization, nitrate reductase.

INTRODUÇÃO

O rendimento de cereais é o resultado final de vários processos fisiológicos regulados por enzimas, entre as quais a Redutase de Nitrato. Esta enzima é responsável pela redução de nitrato a nitrito dentro da planta e sua atividade representa o influxo potencial de nitrogênio reduzido à planta.

Vários trabalhos versando sobre nitrato reductase, suas características e relação com proteína e rendimento tem sido apresentados. Entre estes destacam-se BEEVERS e HAGEMAN (1969), CROY e HAGEMAN (1970) EILRICH e HAGEMAN (1973). HAGEMAN et alii (1976). Visando obter mais informações, planejou-se este experimento que teve como objetivos observar a variação da atividade da reductase do nitrato (ARN) em resposta a adubação nitrogenada e sua relação com proteína e rendimento de grãos em quatro cultivares de cevada.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em um solo franco-arenoso localizado na East Farm da O.S.U. Corvallis OR (USA) em abril de 1977. Os tratamentos consistiram de quatro cultivares de cevada e três níveis de adubação nitrogenada. As cultivares Steptoe e Benton são de teores nor-

mais de proteína enquanto Karl e Larker são de baixo teor. Os tratamentos de nitrogênio foram: zero (testemunha), 60 e 160 Kg de N/ha na forma de nitrato de cálcio. No nível mais alto de N, 100 Kg foram incorporados antes da semeadura e 60 Kg de N/ha foram aplicados em cobertura no estágio reprodutivo com o objetivo de manter altos níveis de nitrato na planta durante todo o ciclo. O desenho experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições.

Determinações da atividade da redutase de nitrato (ARN) foram feitas nas fases de afilhamento, alongamento dos entre-nós, florescimento e enchimento de grãos. As amostras eram constituídas de folhas novas totalmente desenvolvidas incluindo a folha bandeira e as coletas foram feitas entre 13 horas e 13h30min. A ARN foi determinada pelo método *in vivo* de STREETER e BOSLER (1972) porém o tempo de incubação das amostras foi reduzido de 30 para 10 minutos. Nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal, nitratos por destilação a vapor (*) e nitrogênio reduzido pela diferença entre nitrogênio total e nitratos. O influxo teórico de nitrogênio reduzido, multiplicando-se a ARN numa determinada fase pelo peso fresco da parte aérea, multiplicado pelo número de dias de duração desta fase e fez-se a soma total correspondente à duração do ciclo. "Eficiência enzimática" foi determinada dividindo-se o influxo teórico de N pelo influxo real acumulado. "Eficiência de transporte" foi considerada como a percentagem do nitrogênio reduzido acumulado pela planta que foi transportado para os grãos.

Fez-se análise de variância, empregou-se o teste de Duncan a 5% de probabilidade para detectar diferenças entre tratamentos. Também fez-se análises de regressão múltipla, usando-se o modelo de segundo grau, e obtiveram-se coeficientes de determinação (R^2). Estes coeficientes de Determinação foram usados para determinar a relação da atividade enzimática com proteína e produção de grãos.

* Vapor distillation method for nitrate determination in the plant tissues. Soil Science Department. O.S.U. Corvallis OR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da Redutase de Nitrato variou com cultivares, estágio de desenvolvimento e nível de nitrogênio aplicado ao solo conforme mostram as Tabelas 1 e 2.

A atividade média de RN aparentemente não apresentou relação com porcentagem de proteína uma vez que Karl é uma cultivar de baixo teor protéico mas tem a atividade enzimática média maior que Benton que possui elevado teor de proteínas. Entretanto, quando foram calculados o influxo real teórico de nitrogênio reduzido e o influxo para calcular "eficiência enzimática", observou-se que Steptoe e Benton foram mais eficientes em reduzir nitrogênio por unidade de ARN do que Larker e Karl, como mostra a Tabela 1.

Outro fator que pode influenciar a quantidade e porcentagem de proteína no grão é a porcentagem de nitrogênio total da parte aérea que é retido na palha e a porcentagem que é transferida para o grão, chamada de "eficiência de transporte". Steptoe, Larker, Benton e Karl retiveram na palha, na média dos tratamentos com N 32,12; 36,08; 30,21 e 39,40% respectivamente do nitrogênio total acumulado na parte aérea. Houve interação entre cultivares e níveis de N no que se refere a "eficiência de transporte". Em níveis baixos de N, Benton transferiu para o grão uma porcentagem maior de nitrogênio total acumulado na parte aérea enquanto Larker mostrou comportamento oposto. Steptoe e Karl praticamente não variaram em "eficiência de transporte" nos diferentes níveis de adubação nitrogenada aplicada.

TABELA 1 - Atividade da redutase do Nitrato (ARN) média (μ mol de NO_2 reduzido por hora e por grama de folha) Influxo médio teórico (μ mol) expresso em Kg de N reduzido por hectare e eficiência enzimática de quatro cultivares de cevada, média de três níveis de N.

CULTIVAR	ARN	% MÉDIA DE PROTEÍNAS	INFLUXO TEÓRICO	INFLUXO REAL	EFICIÊNCIA ENZIMÁTICA**
Stretton	1,937 a (*)	9,65 b	495	127	3,90
Larker	1,848 abc	11,17 a	529	115	4,60
Bentley	1,813 bc	11,44 a	401	113	3,54
Karl	1,541 c	10,16 b	504	112	4,50

médias seguidas de distintas letras não significativamente diferentes (Teste de Duncan, $p < 0,05$).

** Eficiência Enzimática = influxo teórico/influxo real.

A Tabela 2 mostra a ARN média nos diferentes estádios vegetativos em que foi medida. Quando cada estágio foi analisado separadamente foram detectadas interações entre cultivares e níveis de N nos estádios de afilhamento, florescimento e alongamento dos entre-nós, sendo a ARN mais baixa nos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada. Observou-se que o aumento na ARN em resposta a adubação nitrogenada foi mais acentuada na fase de alongamento dos entre-nós, quando houve aumento médio de 61 e 110% para os tratamentos 60 e 160 Kg N/ha respectivamente, porém, neste estágio a atividade média foi a mais baixa. Sendo um período de grande aumento da área foliar, postulou-se que a diminuição na ARN foi resultado de menor síntese de enzima em favor do crescimento vegetativo. A ARN é regulada pela percentagem de nitrato da folha que é indutora da síntese desta enzima (HEIMER e FILNER, (1971) como também por repressão do produto final (KINSKY, 1969), reserva de aminoácidos (FILNER, 1966), hormônios (LIPS e ROTH-BENJERANO, 1969) e também por fatores ambientais como nutrientes, intensidade luminosa, temperatura, disponibilidade de água, etc (BEEVERS e HAGEMAN, 1969; KESSLER, 1964), este conjunto de fatores poderia explicar a variação observada na ARN nas quatro cultivares em resposta à adubação nitrogenada. Diferenças em atividade enzimática entre cultivares poderiam ser atribuídas a diferenças em induzibilidade entre elas (ZIESERL et alii, 1963). O aumento em ARN após o alongamento dos entre-nós provavelmente refletiu um aumento na necessidade de nitrogênio reduzido para síntese de DNA e RNA para proteínas necessárias à polinização, fertilização e desenvolvimento do grão. Pode ser que nesta fase formas permanente inativas sejam reativadas para atender a grande atividade metabólica que nela ocorrem.

Foram determinados coeficientes de determinação (R^2) nas relações entre níveis de nitrato na planta e ARN. Nos estádios de afilhamento, alongamento dos entre-nós, florescimento e enchimento de grãos os valores R^2 obtidos foram 0,16; 0,49; 0,38 e 0,02 respectivamente. De acordo com HEIMER e FILNER (1971) nem todo nitrato na planta é capaz de induzir a síntese da enzima. Uma parte, de curta duração, capaz

TABELA 2 - Atividade da Redutase de Nitrato (parcelas de NO_3 reduzida por grama de folha por hora) média de quatro cultivares em quatro estádios de desenvolvimento e três níveis de adubação nitrogenada.

NÍVEIS DE N KG/HA	AFILHAMENTO	ALONGAMENTO DOS ENTRE-NÓS	FLORESCIMENTO	ENCHIMENTO DE CRAÇOS	MÉDIA
0	0,982	0,539	1,206	3,653	1,276
60	1,208	0,872	1,133	3,614	1,365
160	1,194	1,133	1,963	4,211	1,700
MÉDIA	1,119 cd (*)	0,848 d	1,434 bc	3,826 a	

* Médias seguidas de letras distintas são significativamente diferentes (Teste Duncan, $P < 0.05$).

de induzir, mas uma reserva de longa duração não o é, ou não é capaz de recompletar a primeira. Provavelmente o tamanho relativo destas duas formas de nitrato varia de acordo com o estágio de desenvolvimento o que explicaria as diferenças nos coeficientes de determinação observados.

A ARN mostrou relação com percentagem média de nitrogênio reduzido nas plantas. Os valores R^2 para os estádios de afilamento, alongamento dos entre-nós, florescimento e enchimento de grãos foram respectivamente 0,34; 0,52; 0,16 e 0,12. Entretanto, quando se calculou o influxo teórico de nitrogênio reduzido e a quantidade total da mesma forma de N da parte aérea, 85% da variação observada no estágio de alongamento dos entre-nós podia ser explicada pela variação da ARN e massa verde total da parte aérea. Um valor relativamente alto considerando que existem diferenças entre cultivares e que "eficiência enzimática não foi levada em consideração.

As relações mais elevadas entre ARN e percentagem de proteína no grão foram observadas no estágio de florescimento. Entretanto houve variação entre cultivares. Os valores dos coeficientes de determinação para Steptoe, Larker, Benton e Karl foram respectivamente 0,57 ; 0,46; 0,72 e 0,65. É provável que no estágio de florescimento a maior parte do N reduzido foi translocado para o grão para a síntese de proteína em vez de ser usado para a formação de folhas. Quanto maior a ARN neste fase maior a quantidade de proteína translocada para o grão. No florescimento a relação entre ARN e proteína total produzida nos grãos por hectare produziu um R^2 no valor de 0,64. O valor mais alto foi da cultivar Benton com R^2 de 0,79 e Karl com o menor valor, 0,55.

O mais alto dos coeficientes de determinação entre ARN e produção total de proteína no grão foram obtidos no estágio de florescimento. Os valores para Steptoe, Larker, Benton e Karl foram, respectivamente, 0,72; 0,51; 0,79 e 0,55. Contudo, quando o fator cultivares não foi considerado o coeficiente de determinação médio baixou para 0,41. O influxo teórico de nitrogênio reduzido considera também

a massa vegetal da parte aérea. Neste caso os coeficientes de determinação para proteína total variaram entre 0,87 para Steptoe e 0,68 para Larker. As quatro cultivares juntas resultaram em um R^2 de 0,65 no florescimento. Este alto valor pode ser devido ao fato de que área foliar dentro de certos limites estar favoravelmente associada a rendimento. Isto também sugere que diferença em "eficiência enzimática" e "eficiência de transporte" não é tão importante como pode parecer e sim a capacidade de toda a área foliar da planta em reduzir uma certa quantidade de nitrogênio por unidade de tempo.

Rendimento de grão é o atributo mais importante em cereais. Os coeficientes de determinação entre ARN e rendimento de grãos variaram entre cultivares e estádios de desenvolvimento, sendo mais altos no alongamento dos entre-nós e florescimento.

Quando não se considerou cultivares, fez-se uma regressão incluindo os quatro genótipos e obtiveram-se os coeficientes de determinação 0,04; 0,55; 0,37 e 0,09 para os estádios de afilamento e alongamento dos entre-nós e enchimento de grãos, respectivamente. Neste experimento a equação de regressão $Y = 1559,69 + 345,00X - 119,50X^2$ poderia prever o rendimento médio das quatro cultivares estudadas. O maior grau de associação observado no alongamento dos entre-nós poderia ser relacionado à quantidade total de folhas que, por sua vez, poderia estar associada ao rendimento potencial da planta.

O influxo teórico de nitrogênio reduzido resultou em coeficientes de determinação de 0,76 e 0,55 nos estádios de alongamento dos entre-nós e florescimento, respectivamente. HAGEMAN et al (1976) afirmam que uma característica fisiológica deveria ter uma razoável relação com rendimento ou qualidade do produto embora não definissem o que é "razoável". FISHER (1975) afirmou que coeficientes de correlação, mesmo nos baixos valores de $r = 0,30$ são úteis, especialmente se fosse possível combinar uma série de características relacionados com o rendimento.

Fez-se uma análise de regressão múltipla para estudar a contribuição da ARN, "eficiência enzimática" e "eficiência de transporte" no

rendimento de grãos e produção de proteína no grão, considerando-se a ARN no estágio de alongamento dos entre-nós. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos.

Os dados sugerem que a atividade da redutase de nitrato e o influxo diário de nitrogênio reduzido que é baseado na ARN e massa verde acima do solo são dois fatores que mais contribuíram para a produção de grãos e proteína total no grão nas quatro cultivares de cevada estudadas. As contribuições de "eficiência enzimática" e, principalmente, de "eficiência de transporte" foram relativamente pequenas. Apesar destas variáveis explicarem a maior parte da variação em rendimento e produção de proteína observados, existem outros fatores não detectados que também são importantes. Os resultados observados incentivam o estudo da atividade de enzimas para melhor compreender e melhorar a produção de grãos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 - BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H. - Nitrate reduction in higher Plants. **Annual Review of Plant physiology**. 20:495-522. 1969.
- 2 - CROY, L. T. & HAGEMAN R. H. - Relationship of Nitrate Reductase Activity to grain protein production in wheat. **Crop Science**. 10:280-285. 1970.
- 3 - EILSICH, G. L. e HAGEMAN, R. H. - Nitrate reductase Activity and its relationship to accumulation of vegetative and grain Nitrogen in Wheat (*Triticum aestivum*, L.). **Crop Science**. 13:59-65. 1973.
- 4 - FILNER, P. - Regulation of Nitrate Reductase Activity in Cultured Tobacco Cells. **Biochimica and Biophysica Acta**. 118:299-310, 1966.
- 5 - FISHER, R. A. - Future Role of Physiology in Wheat Breeding. 2nd International Winter Wheat Conference Proceedings, Zaqes, Yugoslavia, p. 178-196, 1975.
- 6 - HAGEMAN, R. H.; LAMBERT, R.J.; LOUSSAERT, D.; DULLING, M. e KLEPPER, L. A. - Nitrate and Nitrate Reductase as factors limiting Protein Synthesis. In: **Genetic Improvement of Seeds Protein. Proceedings of a Workshop**. Nation Acad. of Sciences. Washshington, D. C. p. 103-134. 1976.
- 7 - HELMER, Y. M.; FILNER, P. - Regulation of Nitrate Assimilation Pathway in Cultured Tobacco Cells. III - The Nitrate System.

Biochimica ans Biophysica Acta. 230:362-372,1971.

- 8 - KESSLER, E. - Nitrate Assimilation by Plants. **Annual Review of Plant Physiology, 15:57-72, 1964.**
- 9 - KINSKY, S. C. - Induction and Regression of Nitrate Reduction in **Neurospora crassa. Journal of Bacteriology, 82:888-904, 1961.**
- 10 - LIPS, S. H. e ROTH-BEJERANO, N. - Light and Hormones: Intergeability in the Induction of Nitrate Reductase. **Science, 166:119-123, 1969.**
- 11 - STREETER, J. G. e BOSLER, M. E. - Comparison of **in vitro** and **in vivo** Assays of Nitrate Reduction in Soybean Leaves. **Plant Physiology, 49:448-450. 1972.**
- 12 - ZIESERL, J. F.; RIVERBANK, W. L. e HAGEMAN, R. H. Nitrate Reductase Activity, Protein Content and Yeld of Four Hybrids at varying Plant Populations. **Crop Science. 3:27-32. 1963.**