



Atividade da enzima nitrato redutase em cultivares de arroz de terras altas

Nitrate reductase enzyme activity in upland rice cultivars

Edemar Moro¹, Carlos Alexandre Costa Crusciol², Adriano Stephan Nascente³, Heitor Cantarella⁴

¹Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Faculdade de Ciências Agrárias. Rodovia Raposo Tavares, Km 572, CEP 19067-175, Presidente Prudente, São Paulo.

²Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Departamento de Produção Vegetal, Botucatu, São Paulo.

³Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás.

⁴Instituto Agronomico de Campinas - IAC, Campinas, São Paulo.

*Autor para correspondência: adriano.nascente@embrapa.br

Recebido em: 11/09/2013

Aceito em: 12/11/2013

Resumo. O cultivo do arroz no ambiente terras altas parece ser, dentre as principais culturas, o menos adaptado ao sistema plantio direto (SPD). Uma das razões atribuídas para esta menor adaptação ao SPD seria a baixa atividade da enzima nitrato redutase (NR), o que dificultaria a assimilação de nitrogênio pelas plântulas. Entretanto, pode haver diferenças entre os genótipos quanto à atividade dessa enzima. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade da enzima NR em distintos cultivares de arroz de terras altas e em diferentes épocas do início de desenvolvimento da cultura. O experimento foi conduzido em condições controladas, em delineamento experimental em blocos completos casualizados com os tratamentos arranjos em esquema fatorial, 10 (cultivares de arroz) x 4 (épocas de avaliações), com quatro repetições. As avaliações da atividade da enzima NR foram realizadas no terço médio do tecido foliar fresco. Houve interação entre cultivares e épocas de avaliação ($p=0,0178$). A atividade enzimática da NR foi superior na cultivar IAC 202, aos 7 dias após a emergência (DAE). Aos 14 DAE, as cultivares Carajás, IAC 202, BRS Sertaneja, BRS Bonança e BRS Curinga apresentaram elevada atividade desta enzima. Aos 21 DAE, a atividade da NR foi superior nas cultivares Primavera e BRS Bonança. Entretanto, aos 28 DAE, não houve diferenças entre as cultivares quanto a esta variável. Conclui-se que atividade da enzima NR, na cultura do arroz de terras altas, é dependente da cultivar, do período de desenvolvimento vegetal e decresce com o avanço do ciclo da cultura.

Palavras-chave: amônio, nitrogênio, *Oryza sativa*, sistema plantio direto

Abstract. The cultivation of upland rice seems to be, among the major crops, the least adapted to the no-tillage system (NTS). One of the reasons attributed to this lower adaptation to NTS would be the low activity of the nitrate reductase enzyme (NR), which would hinder the nitrogen absorption by seedlings. However, there may be differences in the enzyme activity among the rice genotypes. Therefore, the aim of this study was to evaluate the activity of NR enzyme in distinct upland rice cultivars and in different times of crop early development. The experiment was performed under controlled conditions, with experimental design in a completely randomized block in factorial scheme 10 (rice cultivars) x 4 (assessment times) with four replications. The evaluations of NR activity were carried out in the middle third of fresh leaf tissue. There was interaction between cultivars and evaluation time ($p = 0.0178$). The enzymatic activity of NR was higher in IAC 202, at 7 days after emergence (DAE). At 14 DAE, the cultivars Carajás, IAC 202, BRS Sertaneja, BRS Curinga and BRS Bonança showed high activity of this enzyme. At 21 DAE, the enzymatic activity was higher in cultivars Primavera and BRS Bonança. However, at 28 DAE, there were no differences among cultivars for this variable. We conclude that NR enzyme activity in upland rice crop is dependent of cultivar, period of plant development and decreases with the advancement of the crop cycle.

Keywords: Ammonium, nitrogen, *Oryza sativa*, no-tillage system.



O Sistema Plantio Direto (SPD) se destaca por possibilitar uma série de benefícios ambientais, pois reduz a erosão laminar do solo e diminui o carreamento de fertilizantes e agrotóxicos para os mananciais de água, garantindo menor poluição das águas superficiais e favorece o aumento da matéria orgânica do solo, com reflexos positivos na produtividade das culturas (Nascente et al., 2013; Nascente & Crusciol, 2012).

O arroz pode ser plantado no ecossistema terras altas ou de várzeas (Farooq et al., 2009; Fidelis et al., 2011; Nunes et al., 2012). No ambiente terras altas o arroz é cultivado no sistema de sequeiro ou irrigado por aspersão convencional. Nesse sentido, segundo Kluthcouski et al. (2000) o arroz de terras altas parece ser, dentre as principais culturas, o menos adaptado ao SPD. Uma das razões atribuídas para esta menor adaptação da cultura ao SPD seria a baixa atividade da enzima nitrato redutase (NR) que dificultaria a absorção de nitrogênio pelas plântulas de arroz (Malavolta, 1980; Holzschuh et al., 2009; Poletto et al., 2011; Araujo et al., 2012). A NR é a primeira enzima que atua no processo de assimilação do nitrogênio nas plantas, sendo responsável pela redução do nitrato a nitrito (Purcino et al., 1994). Experimentos desenvolvidos por Sá (1999), D'Andréa et al. (2004) e Pacheco et al. (2011) mostraram que no SPD há uma maior disponibilidade de $N-NO_3^-$ no solo em relação ao plantio convencional (PC) devido ao ambiente SPD possuir mais umidade, teor de nutrientes e maiores quantidades de matéria orgânica favorecendo uma maior atividade microbiológica, em especial das bactérias nitrificadoras.

Neste sentido, foram observadas diferenças entre os genótipos de arroz quanto à atividade da enzima NR (Ta & Ohira, 1981; Barlaan & Ichii, 1996; Badan, 2003; Ouko, 2003; Justino et al., 2006). Entretanto no Brasil poucos são os estudos onde se avaliou a atividades da enzima NR em cultivares de arroz de terras altas, tendo-se a indagação se realmente estas novas cultivares possuem baixa atividade da NR no início de seu desenvolvimento. Dessa forma, partindo-se da hipótese de que cultivares de arroz possuem diferenças na atividade da enzima NR, o objetivo deste trabalho foi de determinar a atividade da enzima NR em cultivares de arroz de terras altas no início de desenvolvimento da cultura.

O experimento foi realizado em casa de vegetação com temperatura variando de 15 a 28 °C e

umidade relativa variando de 40 a 90%. O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho eutrófico proveniente de uma área sob SPD já consolidado. Foram utilizadas amostras deformadas com as seguintes características químicas (Raij et al., 2001) na camada 0-20 cm: matéria orgânica, 29,9 g dm^{-3} ; NO_3^- 14 mg dm^{-3} ; pH (1:2,5 solo/suspensão de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}), 5,60; P (resina), 26,3 mg dm^{-3} ; K, Ca e Mg trocáveis de 3,4, 55,0 e 30,0 mmol $_c$ dm^{-3} , respectivamente, acidez total em pH 7,0 (H + Al) de 31 mmol $_c$ dm^{-3} , capacidade de troca de cátions total (CTC) de 119 mmol $_c$ dm^{-3} , saturação por bases (V) de 74 %.

O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados com os tratamentos arranjados em esquema fatorial 10 x 4, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de dez cultivares de arroz (Caiapó, Carajás e IAC-25 – grupo tradicional; Primavera, IAC 202 e BRS Sertaneja – grupo intermediário; e BRS Bonanca, BRS Curinga, Maravilha e BRS Talento – grupo moderno) e quatro épocas de avaliação (7, 14, 21 e 28 dias após a emergência do arroz).

Cada unidade experimental constitui-se de um vaso plástico com oito litros de capacidade, totalmente preenchido com material de solo peneirado (malha 2 mm) e adubado com 150 mg dm^{-3} de P e 80 mg dm^{-3} de K. Não foi fornecido N, para que este nutriente não alterasse a atividade da enzima NR. Foram semeadas 20 sementes por vaso e, após a germinação, mantidas as 10 plantas mais uniformes. Os vasos foram irrigados para manutenção do teor de água do solo em 80% da capacidade de campo. O volume de reposição de água foi determinado por meio da pesagem dos vasos.

Para avaliar a atividade da nitrato redutase, foram pesados 200 mg de tecido foliar (provenientes do terço médio) e colocada em tubos de ensaio com 5 mL de solução de incubação (Jaworski, 1971). Esta solução foi constituída por tampão fosfato (KH_2PO_4 0,1 M; pH 7,5), KNO_3 (0,1M), n-propanol (3% v/v) e NADH (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida). O n-propanol foi usado para aumentar a permeabilidade celular ao nitrato e ao nitrito. O NADH foi utilizado como doador de elétrons para ativação da enzima nitrato redutase. Isto foi necessário porque o congelamento das amostras em nitrogênio líquido inativou o NADH presente naturalmente na planta. O tecido vegetal, submerso na solução de incubação, foi



filtrado a vácuo durante um minuto com descanso de 30 segundos. Este procedimento foi repetido três vezes e teve por finalidade aumentar a penetração da solução nos tecidos.

Após a infiltração, os tubos foram cobertos com papel alumínio e mantidos, na ausência de luz, em banho-maria a 30 °C, por 30 minutos. Finalizada a incubação efetuou-se a filtragem do material. O material filtrado foi diluído oito vezes em tampão fosfato. Desta diluição retirou-se uma alíquota de 1 mL a qual foi adicionado 1 mL de sulfanilamida 1% (para interromper a reação) e 1 mL de N-naftil-etilenodiamino 0,02%. Após a adição destes reagentes, procedeu-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em μmoles de NO₂⁻ liberados por grama de matéria fresca na solução de incubação no período de uma hora (μmoles de NO₂⁻ h⁻¹ g⁻¹ mf⁻¹) com base na curva padrão de NaNO₃ (0, 5, 10, 20, 25, 40 e 50 μM) de acordo com a metodologia proposta por Jaworski (1971).

Após a verificação de que os dados

possuíam homogeneidade de variâncias, normalidade e independência dos resíduos, procedeu-se a análise de variância (p<0,05). As médias foram comparadas pelo teste LSD a 5% de probabilidade. Para o fator época de avaliação (DAE) foi realizada a análise de regressão (5% de probabilidade).

Houve diferenças na atividade da enzima NR entre as cultivares de arroz e entre épocas de avaliação (Tabela 1). Aos 7 DAE a maior atividade da NR foi na cultivar IAC 202; e, aos 14 DAE nas cultivares Carajás, IAC 202, BRS Sertaneja, BRS Bonança e BRS Curinga. Na terceira coleta (21 DAE) a atividade da NR foi maior nas cultivares Primavera e BRS Bonança. Aos 28 DAE não houve diferenças entre as cultivares quanto a atividade enzimática. Em outros trabalhos, Ta & Ohira (1981), Barlaan & Ichii (1996), Badan (2003), Ouko (2003) e Justino et al. (2006) também foram observadas diferenças entre as cultivares de arroz quanto a atividade da NR, o que pode estar relacionado a origem genética dos materiais.

Tabela 1. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas de dez cultivares de arroz no início do desenvolvimento da cultura. Botucatu-SP, 2009

Cultivares de arroz	Dias apos a emergência				Média
	7	14	21	28	
	----- ¹ NO ₂ ⁻ (μM g de matéria fresca h ⁻¹)-----				
Caiapó	11,1d	9,5b	6,9bc	6,7a	8,5
Carajás	12,0cd	11,7a	6,4c	6,2a	9,0
IAC-25	12,9bc	9,2bc	5,4c	7,1a	8,6
Primavera	11,2d	9,7b	8,4ab	7,7a	9,2
IAC 202	15,7a	11,7a	6,7bc	7,6a	10,4
BRS Sertaneja	12,0cd	10,5ab	7,4bc	7,7a	9,4
BRS Bonança	13,1bc	11,1a	9,8a	8,5a	10,6
BRS Curinga	11,1d	11,7a	7,4bc	7,4a	9,4
Maravilha	13,6bc	7,9c	7,2bc	7,1a	9,0
BRS Talento	12,6c	8,5bc	7,5bc	8,0a	9,2
Média	12,5	10,2	7,3	7,4	-
Fontes de variação	Análise de variância				
	Graus de liberdade		Probabilidade do teste F		
Blocos	3		0,8321		
Cultivares (C)	9		<0,001		
Época avaliação (E)	3		<0,001		
C x E	-		0,2879		

¹A atividade da nitrato redutase foi expressa pela quantidade de nitrito (NO₂⁻) formado. Letras minúsculas nas colunas comparam as cultivares, letras maiúsculas nas linhas comparam épocas de avaliação. Médias seguidas pelas mesmas letras (maiúscula ou minúscula) não diferem entre si pelo teste de t – LSD (P=0,05).

Segundo Santos (2007), que avaliou a tradicional (Piauí) e melhorada (IAC-47), a maior atividade enzimática em duas cultivares de arroz, atividade da NR ocorreu na variedade tradicional.

Para a melhor compreensão quanto a absorção e assimilação do nitrogênio por cultivares de arroz, é preciso antes conhecer a origem desses materiais. O arroz cultivado é dividido em dois grandes grupos (sub-espécies): o Indica e o Japônica, sendo que no grupo Japônica são reconhecidos dois subgrupos temperado e tropical (Santos et al., 2006).

Assim, em estudo com 53 cultivares de arroz do grupo Japônico e Indico, observou-se que a atividade da enzima NR foi maior nas espécies do grupo Indico, com atividade 30% superior as espécies do grupo Japônica (Barlaan & Ichii, 1996). A maior eficiência na utilização do N por espécies do grupo Indica também foi constatada por Ta & Ohira (1981). Ouko (2003) acrescenta que maiores variações na atividade da NR ocorre nas cultivares adaptadas ao ecossistema de terras altas (grupo Japônica).

Observou-se também que a atividade da NR foi reduzida ao longo do ciclo das cultivares de arroz (Figura 1). Os dados de todas as cultivares foram ajustados por modelos matemáticos polinomiais de segundo grau. Assim, com o desdobramento das épocas de coleta para cada cultivar, constatou-se que a atividade da NR aos 7 DAE foi maior em relação as demais épocas, ocorrendo tendência de

estabilização entre as avaliações dos 21 e 28 DAE para as cultivares IAC 202, BRS Talento, Maravilha e IAC 25.

Esses resultados confrontam a teoria de que a atividade da enzima NR é baixa no início do desenvolvimento do arroz e aumenta com o decorrer do tempo (Malavolta, 1980). Uma das hipóteses seria de que a maioria dos trabalhos onde se avaliou a atividade desta enzima foi no ambiente com manejo convencional do solo, em que predomina maiores quantidades de amônio em relação ao nitrato, sendo que no SPD há maior predominância de nitrato (Sá, 1999; D'Andréa et al., 2004; Nascente et al., 2012). Com o avanço do desenvolvimento do arroz no SPD, provavelmente ocorreu maior conversão do amônio em nitrato, causando a redução da atividade da enzima NR. Segundo Fernandes & Rossielo (1986) a utilização combinada de nitrato e amônio pode promover aproveitamento direto da forma amoniacal, com a formação de compostos nitrogenados como proteínas estruturais e enzimas, as quais poderiam estimular a ação do sistema nitrato redutase, uma vez que o nitrato acumulado não induziria a ação enzimática.

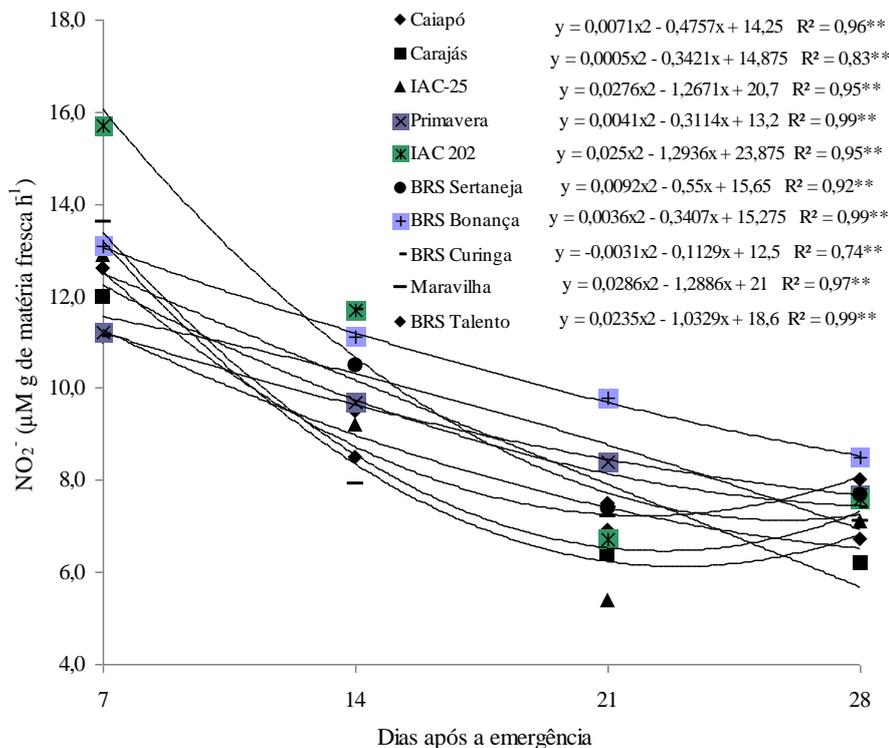


Figura 1. Atividade da enzima nitrato redutase em função dos dias após a emergência do arroz. Média de 10 cultivares. **significa significativo para $p < 0,01$.



Diante disso, verifica-se que novos estudos devem ser realizados no SPD, avaliando-se também os teores de amônio e nitrato no solo para tentar correlacionar a atividade da NR com as formas de N no solo e seus efeitos no desenvolvimento das cultivares de arroz.

Sumarizando, constata-se que a atividade da enzima nitrato redutase diminui com o aumento da idade das plantas nas cultivares de arroz de terras altas. Com relação às cultivares, verifica-se que houve interação com a época de avaliação, sendo que na primeira avaliação (7 DAE) se destacou a cultivar IAC 202; aos 14 DAE a atividade da NR foi maior nas cultivares Carajás, IAC 202, BRS Sertaneja, BRS Bonança e BRS Curinga. Na terceira coleta (21 DAE) foi maior nas cultivares Primavera e BRS Bonança. Entretanto, na última avaliação (28 DAE) não houve diferenças entre as cultivares quanto à atividade enzimática.

Agradecimentos

À FAPESP pelo financiamento da pesquisa e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa concedida ao segundo autor.

Referências

ARAUJO, J.L.; FAQUIN, V.; VIEIRA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.V.C.; SOARES, A.A.; RODRIGUES, C.R.; MESQUITA, A.A. Crescimento e produção do arroz sob diferentes proporções de Nitrato e de Amônio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 3, p. 921-930, 2012.

BADAN, A.C.C. **Ganho com seleção e diversidade genética: medidas para monitorar o melhoramento populacional de arroz**. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003.

BARLAAN, E.A.; ICHII, M. Genotypic variability in nitrate assimilation in rice. In: **THIRD INTERNATIONAL RICE GENETICS SYMPOSIUM**, Manila. **Anais...**, Manila: International Rice Research Institute. p. 434-440, 1996.

D'ANDRÉA, A.F.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; GUILHERME, L.R.G. Estoque de carbono e formas de nitrogênio mineral em solo submetido a diferentes sistemas de manejo. **Pesquisa**

Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 2, p. 179-186, 2004.

FAROOQ, M.; KOBAYASHI, N.; WAHID, A.; ITO, O.; BASRA, S.M.A. Strategies for producing more rice with less water. **Advances in Agronomy**, v.101, p.351-388. 2009.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELO, R.O.P. Aspectos do metabolismo e utilização do nitrogênio em gramíneas tropicais. In: MATTOS, H.B.; WERNER, J.C.; YAMADA, T. (Eds.). **Calagem e adubação de pastagens**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 93-123.

FIDELIS, R.R.; ROTILI, E.A.; SANTOS, M.M.; BARROS, H.B.; MELO, A.V.; DOTTO, M. Eficiência no uso de nitrogênio em cultivares de arroz irrigado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.6. n.4, p.622-626, 2011

HOLZSCHUH, M.J.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I.; MEURER, E.J.; CARMONA, F.C.; COSTA, S.E.V.G.A. Rice growth as affected by combined ammonium and nitrate supply. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.5, p.1323-1331, 2009.

JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, n. 6, p. 1274-1279, 1971.

JUSTINO, G.C.; CAMBRAIA J.; OLIVA, M.A.; OLIVEIRA, J.A. Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1285-1290, 2006.

KLUTHCOUSKI, J.; FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D.; RIBEIRO, C.M.; FERRARO, L.A. Manejo do solo e o rendimento de soja, milho, feijão e arroz em plantio direto. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 1, p. 97-104, 2000.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

NASCENTE, A.S.; CRUSCIOL, C.A.C. Cover crops and herbicide timing management on soybean yield under no-tillage system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 187-192,



2012.

NASCENTE, A.S.; CRUSCIOL, C.A.C.; COBUCCI, T. Ammonium and nitrate in soil and upland rice yield as affected by cover crops and their desiccation time. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1699-1706, 2012.

NASCENTE, A.S.; CRUSCIOL, C.A.C.; COBUCCI, T. The no-tillage system and cover crops - Alternatives to increase upland rice yields. **European Journal of Agronomy**, v. 45, n. 2, p. 124-131, 2013.

NUNES, T.; ADORIAN, G.; TERRA, T.; LEAL, T.; SANTOS, A.; RAMOS, P. Aspectos produtivos de linhagens de arroz de terras altas sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, n.1, p. 51-57, 2012.

OUKO, M.O. **Nitrate reductase activity in rice as a screening tool for weed competitiveness**. 73 p. Master Dissertation - University of Agriculture, Bonn, 2003.

PACHECO, L.P.; BARBOSA, J.M.; LEANDRO, W.M.; MACHADO, P.L.O.O.; ASSIS, R.L.; MADARI, B.E.; PETTER, F.A. Produção e ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura nas culturas de arroz de terras altas e de soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.5, p.1787-1800, 2011.

POLETTO, N.; MUNDSTOCK, C. M.; GROHS, D. S.; MAZURANA, M. Padrão de afilamento em arroz afetado pela presença dos íons amônio e nitrato. **Bragantia**, v.70, n.1, p.96-103, 2011.

PURCINO, A.A.C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A.T.; MARRIEL, I.E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de N. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 1, p. 41-46, 1994.

RAIJ, B.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico. 2001. 285 p.

SÁ, J.C.M. Manejo da fertilidade do solo no sistema plantio direto. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA,

F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Eds.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBRS:UFLA/DCS. 1999. p. 267-319.

SANTOS, A.M. **Absorção, assimilação e remobilização de nitrogênio em arroz, sob nutrição nítrica: Avaliação da expressão gênica diferencial**. 93 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

SANTOS, A.B.; STONE, L.F.; VIEIRA, N.R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2006. 1000p.

TA, T.C.; OHIRA, K. Effects of various environmental and medium conditions on the response of Indica and Japonica rice plants to ammonium and nitrate nitrogen. **Soil Science & Plant Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 347-355, 1981.