

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DE DIFERENTES RELAÇÕES FOLHAS/GRÃOS SOBRE O
METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM DIFERENTES PARTES DA
PLANTA DE MILHO**

Cesar José da Silva
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL –São Paulo - Brasil
Fevereiro – 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EFEITO DE DIFERENTES RELAÇÕES FOLHAS/GRÃOS SOBRE O
METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM DIFERENTES PARTES DA PLANTA
DE MILHO

Cesar José da Silva

Orientador: Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA – Área de concentração em Produção Vegetal.

JABOTICABAL -SP
Fevereiro – 2002

Silva, Cesar José da
S586e Efeito de diferentes relações folha/grãos sobre o metabolismo do
nitrogênio em diferentes partes da planta de milho/ Cesar José da
Silva. – – Jaboticabal, 2002
x, 64 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002
Orientador: Jairo Osvaldo Cazetta
Banca examinadora: Antonio Álvaro Corsetti Purcino, Marcelo
Murad Magalhães
Bibliografia

1. Metabolismo do nitrogênio em milho. 2. Relações fonte/dreno.
3. Transaminases. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CESAR JOSÉ DA SILVA – Nascido em Marechal Cândido Rondon – PR em 04/10/1977, filho de José Fulgêncio da Silva e Renata Kamphorst da Silva, formou-se Técnico em Agropecuária no Colégio Agrícola Estadual “Manoel Moreira Pena”, Foz do Iguaçu – PR, em 7/12/1994. Formou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, em 17/12/1999, onde além das atividades curriculares participou do movimento estudantil sendo presidente do Centro acadêmico na gestão 96/97. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq de julho de 1999 a fevereiro de 2000 e participou de projetos de difusão de tecnologia e extensão. Ingressou no curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP em março de 2000.

Oração do Agrônomo

Herdarás o solo sagrado e a fertilidade será transmitida de geração em geração.

Protegerás teus campos contra a erosão e tuas florestas contra a desolação.

Impedirás que tuas fontes sequem e que teus campos sejam devastados pelo gado.

Para que teus descendentes tenham abundância para sempre.

Aos meus pais, José Fulgêncio e Renata, pelo exemplo de vida e bravura
no trabalho árduo praticado diariamente para possibilitar nossa
formação

OFEREÇO.

Ao meu filho Igor Röder da Silva

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por olhar por mim.

A FAPESP, pela bolsa de mestrado e pelos recursos financeiros que viabilizaram a execução do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta, pelo incentivo, pela valiosa contribuição em minha formação profissional e pela oportunidade que tive em aprofundar meus conhecimentos na área de metabolismo de plantas.

A CAPES, pela bolsa concedida nos primeiros seis meses de mestrado.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, através do Curso de Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal, em especial ao departamento de Tecnologia, pela Oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Técnico Agrícola Marcelo Scatolin da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Unesp, pela colaboração na instalação, condução e coleta de material do experimento.

Aos Professores Wanderley José de Melo, João Suzuki e Arthur Bernardes Cecílio Filho, por permitirem o uso de liofilizadores e estufas de seus laboratórios.

Ao estagiário Anderson Kaufmann e Everton Molina Campos pela ajuda na instalação dos tratamentos e coletas de material no campo.

Aos colegas de mestrado Uilson Fernando Matter e Adilson Pelá, pela convivência e pela ajuda com este trabalho.

A Cláucia Aparecida Honorato da Silva, pelo carinho, compreensão, companheirismo, pela ajuda.

A Família Röder que com muito amor, carinho e dedicação cuidam de meu filho enquanto estou ausente.

SUMÁRIO

	Página
TÍTULO - RESUMO	viii
PALAVRAS CHAVE	ix
TITLE – ABSTRACT	ix
KEYWORDS	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Objetivos específicos	2
Revisão de literatura	2
Referências Bibliográficas	7
CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1	11
Alterações da proporção fonte-dreno e seus efeitos sobre o metabolismo do nitrogênio e desenvolvimento de plantas de milho	11
Resumo	11
Termos adicionais para indexação	12
Source-Sink relationship alteration and its effect on the nitrogen metabolism and the development of maize plants	12
Abstract	12
Additional index terms	13
Introdução	13
Material e Métodos	15
Resultados e Discussão	17
Conclusões	33
Agradecimentos	34
Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2	38
Proteína solúvel, Glutamato Oxaloacetato Transaminase, Glutamato Piruvato Transaminase e produção em plantas de milho submetidas a diferentes proporções folha-grãos	38

Resumo	38
Termos adicionais para indexação	39
Soluble protein, glutamato oxaloacetato transaminase, glutamato piruvato transaminase and production in plants of corn submitted to different proporções leaves/grains	40
Abstract	40
Additional index terms	41
Introdução	41
Material e Métodos	43
Resultados e Discussão	45
Conclusões	60
...Agradecimentos	60
Referências Bibliográficas	60
CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES	63

EFEITO DE DIFERENTES RELAÇÕES FOLHAS/GRÃOS SOBRE O METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM DIFERENTES PARTES DA PLANTA DE MILHO

RESUMO - Embora esteja bem estabelecido pelos experimentos clássicos, qual são os fatores que limitam a produção, o funcionamento da planta na fase reprodutiva que envolve um complexo relacionamento tanto entre órgãos fonte e dreno de fotossintatos como do metabolismo do nitrogênio em ambos os tipos de órgãos, ainda permanece pouco esclarecido. Assim sendo, na fase de polinização foram impostas diferentes proporções de folhas (% de fonte) e de grãos (% de dreno) em plantas de milho para estudar o efeito destes tratamentos sobre o comportamento do metabolismo do nitrogênio em grãos, folhas e colmos, em diferentes etapas da fase reprodutiva da cultura e suas relações com a produção de massa seca, desenvolvimento de grãos, bem como desenvolvimento e senescência das folhas. Avaliou-se atividade de algumas enzimas, o teor dos principais metabólitos nitrogenados nas folhas, nos colmos e nos grãos em formação, bem como os reflexos destas variáveis sobre algumas características agrônômicas aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap). Os resultados do presente trabalho permitiram esclarecer que a atividade da redutase do nitrato na folha não foi afetada pelas alterações nas proporções de fonte e dreno de fotossintatos. Os teores de N-total, N-nitrato e N-aminoácidos livres, nas folhas, colmos e endospermas foram mais intensamente afetados quanto mais drásticas foram as reduções de folhas ou grãos. As reduções da fonte e dreno promoveram aumentos significativos nos teores de N-total, N-nitrato e N-aminoácidos livres nas partes remanescentes analisadas. Os teores de proteína solúvel foram mais afetados nos grãos, onde os maiores valores foram encontrados aos 10 dap., nos tratamentos sem folhas e sem grãos. A GOT e GPT tiveram atividades máximas aos 10, 20 e 10 dap em grãos, folhas e colmos, respectivamente, sendo que o desfolhamento total e a ausência de grãos na espiga estimularam a atividade das transaminases nas diferentes partes da planta. A atividade da GPT foi 95%, 31% e 61% inferior à da GOT nas folhas, endospermas e colmos, respectivamente. O controle do número de grãos não afetou a massa seca das folhas ao longo do período avaliado ao passo que a massa seca dos colmos diminuiu com a redução do número de folhas por planta e aumentou com a

redução do número de grãos, efeito visualizado aos 20 dap. As reduções de 66% e 33% no número de folhas reduziram a produção de grãos aos 30 dap em 58% e 20%, respectivamente e a redução de 75% e 50% no número de grãos, promoveu a produção de 17% e 48%, respectivamente, quando comparados ao controle.

Palavras Chave: aminoácidos livres, metabolismo do nitrogênio, N-nitrato, redutase do nitrato, relações fonte – dreno, transaminases

EFFECT OF DIFFERENT RELATIONSHIP LEAVES/GRAINS ON THE METABOLISM OF THE NITROGEN IN DIFFERENT PARTS OF MAIZE PLANT

ABSTRACT: Although it is well very established, for the classic experiments, which are the factors that limit the production, the operation of the plant in the reproductive phase that involves a compound so much relationship between organs source and fotossintatos drain as of the metabolism of the nitrogen in both types of organs, it remains unclear. Like this being, in the pollination phase different proportions of leaves were imposed (% of source) and of grains (% of drain) in corn plants to study the effect of these treatments on the behavior of nitrogen metabolism in grains, leaves and stems, in different stages during reproductive phase of the culture and your relationships with the production of dry mass, development of grains, as well as development and senescence of leaves. Enzymes activity were evaluated (NR, TGO and TGP), the level of main metabolites (N-total, N-nitrate, free amino acids and soluble protein) in the leaves, in the stems and in the grains in formation, as well as the reflexes of these varied on the agronomic characteristics (mass evaporates of leaves stems and grains), to the 2, 10, 20 and 30 days after the pollination (dap). The results of the present work allowed to clear that the activity of the nitrate reductase in the leaf was not affected by the alterations in the source proportions and photoassimilated drain. The levels of N-total, N-nitrate and free N-amino acids, in the leaves, stems and endosperms were more intensely affected the more drastic they were the reductions of leaves or grains. The reductions of the source and drain promoted significant increases in the levels of N-total,

N-nitrate and free N-amino acids in the analyzed remaining parts. The soluble protein concentration was more affected in the grains, where the largest values were found to the 10 dap, in the treatments without leaves and grains. TGO and TGP had maximum activities to the 10, 20 and 10 dap in grains, leaves and stems, respectively, and the total defoliation and the absence of grains in the ear of corn stimulated the activity of the transaminases in the different parts of the plant. The activity of TGP was 95%, 31% and 61% inferior to the one of TGO in the leaves, endosperms and stems, respectively. The grains number didn't affect the mass it evaporates of the leaves along the appraised period while the mass evaporates of the stems it decreased with the reduction of the number of leaves for plant and it increased with the reduction of the number of grains, effect visualized at 20 dap. The reductions of 66% and 33% in the number of leaves reduced the production of grains at 30 dap in 58% and 20%, respectively and the reduction of 75% and 50% in the number of grains, promoted the production of 17% and 48%, respectively, when compared to the control.

Key words: free amino acids, metabolism of the nitrogen, N-nitrate, reductase of the nitrate, source/sink relationships, transaminases

CAPÍTULO 1– CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

O que tem levado alguns países a se destacarem na produção de milho com elevadas produtividades é o grande número de pesquisas básicas e a aplicação racional de tais conhecimentos no desenvolvimento de genótipos e técnicas de manejo adequadas às suas condições. Possuindo características edafo-climáticas próprias, relativamente poucos estudos relacionando o metabolismo com os fatores de produção do milho têm sido realizados no Brasil, e grande parte da tecnologia tem sido importada, quase sempre a elevado custo e nem sempre apropriada, ou conveniente, às nossas características de clima, de solo, de biodiversidade ou mesmo econômicas.

Se não atentarmos para esses fatos, de nada valerá ao Brasil o enorme esforço de seus pesquisadores e vultuosos montantes financeiros gastos pelo país no desenvolvimento de trabalhos como os famosos projetos genoma, se não desenvolvermos paralelamente o conhecimento do metabolismo que dá a base teórica sólida para o manejo adequado da cultura e desenvolvimento de novas variedades adequadas às nossas condições. Caso contrário, não saberemos o que fazer com conhecimentos tão específicos como, por exemplo, a seqüência e localização dos genes num determinado cromossomo, pois nem mesmo teremos compreendido claramente o comportamento do metabolismo primário, que é o que governa o desenvolvimento e produção da planta. Não obstante, alguns grupos de pesquisa têm estudado o metabolismo do nitrogênio em plantas cultivadas, porém estas pesquisas dão enfoque principalmente a avaliação de cultivares; nutrição de plantas; fontes, épocas e formas de suprimento de Nitrogênio, sendo escassas as informações sobre o estudo de relações fonte e dreno de fotoassimilados, especialmente em experimentos de campo (Kiniry et al., 1990). Atualmente se conhece bem quais são os fatores que afetam a produção, mas o funcionamento da planta na fase reprodutiva envolve um complexo relacionamento tanto entre órgãos de fonte e dreno de fotoassimilados, como

do metabolismo do nitrogênio em ambos tipos de órgãos, que ainda permanece pouco esclarecido.

Levando em conta o acima exposto, realizou-se o presente trabalho com o objetivo de estudar o comportamento do metabolismo do nitrogênio e suas relações com a produção de massa seca, desenvolvimento de grãos bem como desenvolvimento e senescência das folhas em plantas de milho submetidas a diferentes níveis de fonte e dreno de fotoassimilados, e verificar os efeitos de tais variáveis sobre os fatores de produção, visando contribuir para a compreensão e/ou previsão do comportamento da planta nas diferentes situações a que a cultura for submetida no campo, obtendo informações básicas para compreender aspectos mais específicos do metabolismo e da consequência das proporções folha/grãos sobre a produção de grãos.

Especificamente este trabalho objetivou estudar, ao nível do metabolismo, as consequências do controle da fonte e dreno de fotossintatos sobre a atividade de algumas enzimas: nitrato redutase, glutamato-oxaloacetato transaminase, glutamato-piruvato transaminase; o teor dos principais metabólitos: N-total, N-nitrato, aminoácidos livres, proteína solúvel; nas folhas, colmos e nos grãos em formação, bem como os reflexos destas variáveis sobre as características agronômicas: produção de massa seca nas folhas, colmos e grãos; senescência das folhas; peso médio de 100 grãos; produção final por planta.

REVISÃO DE LITERATURA

A produtividade da cultura do milho no Brasil tem girado em torno de 2.400 kg/ha nos últimos anos, correspondendo à cerca de apenas metade da mundial e a um quarto da apresentada pelos Estados Unidos da América (8.400 kg/ha), que é o líder tanto de produção quanto de produtividade (CONAB, 2001).

Levando em conta que o Brasil vem dispondo de sementes com boa qualidade fitossanitária e bons atributos genéticos, bem como ótimas condições de radiação para o processo fotossintético, considera-se que a baixa produtividade se deva ao manejo da cultura não otimizado para nossas condições edafo-climáticas (FORNASIERI FILHO,

1992). A otimização das condições de cultivo envolve a utilização de variedades adequadas, o fornecimento de água, de nutrientes e de radiação, que devem ser convenientemente gerenciados para possibilitar a maximização da produtividade sem ocasionar prejuízos econômicos para o agricultor nem causar problemas ecológicos (SMICIKLAS e BELOW, 1990). Entretanto, para se direcionar o desenvolvimento de genótipos e manejo apropriados, deve-se dispor do conhecimento dos fatores da produção e dos eventos fisiológicos que os governam.

A produção de milho é uma resultante do produto entre número de espigas, número de grãos em cada espiga e peso médio dos grãos. Na maioria dos casos, entretanto, a produção está mais associada com o número de grãos que com o peso médio dos mesmos, ou com o número de espigas por planta. Por sua vez, para um dado genótipo, o número de grãos que chega à maturidade parece depender mais da sobrevivência das espiguetas fecundadas do que do número potencial de espiguetas (OTEGUI e ANDRADE, 2000). Existem evidências de que a sobrevivência dos óvulos fecundados está correlacionada com as condições ambientais, com as interações entre fonte e dreno de metabólitos, e com a relação entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio durante a fase de formação e desenvolvimento dos grãos. Embora se saiba que plantas submetidas a diferentes tipos de estresse diminuem o número de grãos por planta e, conseqüentemente, a produtividade, os eventos químicos e bioquímicos relacionados às relações fonte-dreno e ao metabolismo nitrogenado, que levam ao estabelecimento/abortamento dos grãos, bem como o desenvolvimento dos mesmos ainda não está muito bem esclarecido (SINGLETERY e BELOW, 1990, FALEIROS *et al.*, 1996; ZINSELMAYER *et al.*, 1999, CAZETTA, *et al.*, 1999, BELOW *et al.*, 2000). Portanto, a compreensão de tais fenômenos e mecanismos determinantes são de extrema importância para os fisiologistas, estatísticos e melhoristas envolvidos com a cultura do milho. No entanto, no Brasil poucos trabalhos têm sido desenvolvidos nesta importantíssima área.

Várias teorias têm sido propostas para explicar o mecanismo que controla a deposição de amido e proteínas em grãos de milho. Segundo OTEGUI e ANDRADE (2000), a capacidade da fonte em destinar matéria seca para o dreno de metabólitos exerce importante controle sobre a fertilidade dos óvulos e o estabelecimento dos grãos.

Por outro lado, estudos realizados com o auxílio da técnica de cultivo de sementes "in vitro" têm demonstrado que os próprios grãos (dreno) possuem elevada atividade metabólica e exercem elevado grau de controle sobre muitos fatores que determinam o abortamento ou o desenvolvimento (SINGLETTARY e BELOW, 1990; SINGLETTARY e BELOW, 1989; FALEIROS *et al.*, 1996). De acordo com MOZAFAR (1990), o abortamento de grãos, que ocorre especialmente na parte apical das espigas, geralmente é atribuído à deficiência de N, mas não está claro o mecanismo responsável por tal fato. Suspeita-se que o mau funcionamento dos mecanismos de transporte de elementos minerais e carboidratos das folhas para os grãos via floema e/ou algum distúrbio no processo de transferência do floema para o endosperma dos grãos sejam responsáveis pelo fenômeno do abortamento de grãos que levam, conseqüentemente, a prejuízos na produtividade. Os grãos que se salvam do abortamento ainda enfrentam duas fases cruciais durante o desenvolvimento, quer sejam: a de divisão celular e a de enchimento. A primeira fase tem duração de mais ou menos 10 dias após a polinização e é caracterizada pelo acúmulo de constituintes solúveis, tais como: N-solúvel, aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, bem como síntese de proteínas, DNA e RNA. Na segunda fase, os constituintes solúveis são utilizados para a biossíntese de macromoléculas, principalmente o amido, sendo que esta é uma fase de desenvolvimento linear do endosperma, em termos de acúmulo de massa seca (INGLE *et al.*, 1965).

Dentre os componentes solúveis do grão, encontra-se a fração albumina, que contém a maioria das proteínas solúveis e principalmente proteínas enzimáticas, atinge a concentração máxima ao redor dos 20 dias após a polinização e diminui nos estágios finais de desenvolvimento do grão (CULLEY *et al.*, 1984, CAZETTA *et al.*, 1999). Muitas dessas enzimas estão envolvidas no metabolismo de carboidratos, na síntese do amido e no metabolismo do N e têm suas atividades significativamente aumentadas durante o período de enchimento do grão (DOHELERT *et al.*, 1988, SINGLETTARY e BELOW, 1989, FALEIROS *et al.*, 1996; CAZETTA *et al.*, 1999).

O nitrogênio desempenha um papel fundamental na manutenção da atividade metabólica responsável pela produção de fotoassimilados na fonte (folha), como também na do dreno (grãos) que, em conjunto determinam o estabelecimento, a formação inicial e

o ritmo de enchimento do grão (BELOW *et al.*, 1981; SINGLETARY *et al.*, 1990; FALEIROS *et al.*, 1996; CAZETTA, *et al.*, 1999).

Além do controle exercido pela sacarose, glicose e frutose, sobre o metabolismo e o desenvolvimento dos grãos, como preconizam DOEHLERT *et al.* (1988), os metabólitos do nitrogênio parecem também afetar a deposição do amido (SINGLETARY e BELOW, 1989; SINGLETARY e BELOW, 1990, CAZETTA *et al.*, 1999). Embora esteja claro que existe uma relação entre o metabolismo de carboidratos e o do nitrogênio (TSAI *et al.*, 1983 SINGLETARY e BELOW, 1989; CAZETTA *et al.*, 1999, BELOW *et al.*, 2000), e que o nitrogênio influencia fortemente o acúmulo dos constituintes do grão, pouco se sabe a respeito da influência de metabólitos do nitrogênio sobre as reações enzimáticas envolvidas na biossíntese de tais constituintes (SINGLETARY *et al.*, 1990; CAZETTA *et al.*, 1999). Além disso, a maioria dos estudos referentes à relação do metabolismo glicídico e nitrogenado têm sido realizada em tecidos vegetativos, porém, devido à elevada atividade metabólica do próprio grão em desenvolvimento é de se esperar que este exerça ponderável grau de controle, tanto sobre o comportamento metabólico do próprio dreno (SINGLETARY *et al.*, 1990; WYSS *et al.*, 1991, CAZETTA, *et al.*, 1999, BELOW *et al.* 2000), como no processo de fotossíntese e mecanismo de senescência da fonte. Sendo assim, é importante que sejam considerados em conjunto quando se pretende estudar o comportamento metabólico tanto da fonte como dos drenos de fotossintatos (SWANK *et al.*, 1982).

O mecanismo de senescência foliar, por exemplo, parece envolver uma interação entre os fenômenos fisiológicos tanto das folhas como dos grãos. De acordo com PRIOL *et al.* (1990), a remobilização de nitrogênio do aparato fotossintético das folhas para os grãos em formação, limita o desenvolvimento da fotossíntese e desencadeia o processo de senescência das folhas e que um dos sinais do desenvolvimento da senescência é a elevação brusca da atividade das enzimas sacarose sintetase e invertase, que normalmente apresentam valores relativamente baixos durante o período de enchimento de grãos.

Entretanto, nossa interpretação é a de que a elevação da atividade das enzimas, descrita por PRIOL *et al.* (1990), é resultado do estímulo induzido pela acumulação de carboidratos na folha, causada pela diminuição da capacidade de drenagem dos grãos em

fase final de enchimento. Portanto, existem evidências de que tanto o fenômeno de abortamento/desenvolvimento dos grãos esteja sujeito ao funcionamento das folhas, como também a atividade e processo de senescência das folhas deve estar na dependência do comportamento do dreno, possivelmente relacionados através dos metabolismos do carbono e nitrogênio.

O metabolismo do nitrogênio depende de vários fatores como absorção, transporte e distribuição dentro da planta e das células, bem como da assimilação bioquímica, fatores estes cuja eficiência, isoladamente ou no conjunto, controlam a produção (CAZETTA, 1997; FALEIROS e CAZETTA, 1994). Em tecidos verdes a assimilação do nitrogênio está intimamente relacionada com as reações da fotossíntese e metabolismo de carboidratos, tanto pela necessidade de energia para redução do nitrato à amônia, como também pelo fornecimento de cadeias carbônicas (α -cetoácidos) necessárias para a incorporação de amônia e a formação dos aminoácidos (NAIK *et al.*, 1982). Existem sérias evidências sugerindo que a cadência de transformação do nitrato em N-orgânico seja controlada pela enzima nitrato redutase (NAIK *et al.*, 1982, WATANABE *et al.*, 1985, FALEIROS e CAZETTA, 1994). Uma vez incorporado à planta o N-orgânico, por sua vez, encontra-se em equilíbrio dinâmico, sendo continuamente desdobradas e sintetizadas substâncias nitrogenadas o que permite o acúmulo e/ou a translocação de N em diferentes órgãos, dependendo da fase de desenvolvimento ou estresse a que a planta está sendo submetida (MALAVOLTA, 1980).

Dentro desse aspecto, existem evidências de que o colmo das plantas de milho funcionem alternativamente como órgão de importação e exportação de metabólitos durante o desenvolvimento da planta e que, dependendo das condições fotossintéticas, do manejo e da demanda pelos demais órgãos, boa parte dos fotossintatos necessária para o desenvolvimento dos grãos em formação pode vir do colmo e não apenas da fotossíntese que está sendo realizada naquela fase (SETTER e FLANNIGAN, 1986; TA *et al.*, 1993). Tal envolvimento entre os fatores intrínsecos da planta e do ambiente é o que dificulta o estudo dos mecanismos de interação, controle e distribuição de massa seca entre a planta mãe (fonte) e o grão em desenvolvimento (depósito) (WYSS *et al.*, 1991).

Em função da complexidade, o funcionamento da planta na fase reprodutiva ainda não está totalmente elucidado e permanece como um tema de grande interesse e atualidade, evidenciados pelos estudos nas áreas de estresse hídrico e metabolismo de carboidratos (ZINSELMAYER *et al.*, 2000), interação dos metabolismos do carbono e nitrogênio (BELOW *et al.*, 2000), regulação hormonal do desenvolvimento dos grãos (JONES e SETTER, 2000), regulação dos fenômenos de polinização (BANZIGER e WESTGATE, 2000), interação entre interceptação luminosa e produção de grãos (OTEGUI e ANDRADE, 2000), prolificidade (TOIT e PRINSLOO, 2000), relação entre parâmetros fisiológicos e características varietais (TOLLENAR *et al.*, 2000), bem como previsão matemática da produção de grãos por plantas de milho (RITCHIE e WEI, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELOW, F.E. *et al.* Availability of reduced N and carbohydrates for ear development of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.68, p.1186-1190, 1981.

BELOW, F.E.; CAZETTA, J.O.; SEEBAUER, J.R. Carbon/Nitrogen interactions during ear and kernel. In: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.). **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.15-24. (Special Publication, 29).

CAZETTA, J.O. **Influência do nitrogênio, fósforo e potássio no metabolismo, no desenvolvimento e na produção de plantas de milho**. 1997. 121f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAZETTA, J.O.; SEEBAUER, J.R.C; BELOW, F.E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels growing in vitro. **Annals of Botany**, London, v.84, p.747-754, 1999.

CULLEY, D.E. et al. Endosperm protein synthesis and L-[³⁵S] methionine incorporation in maize kernels cultured *in vitro*. **Plant Physiology**, Rockville, v.74, p.389-394, 1984.

DOEHLERT, D.C.; KUO, T.M.; FELKER, F.C. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two imbeds of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, p.1013-1019, 1988.

FALEIROS, R.R.S.; CAZETTA, J.O. **Efeito da adubação com nitrogênio, fósforo e potássio sobre a atividade de enzimas envolvidas na síntese do amido em grãos de milho**: relatório de pesquisa Proc. FAPESP 94/5595-0, Jaboticabal, 1994.

FALEIROS, R.R.S.; SEEBAUER, R.J.; BELOW, F.E. Nutritionally induced changes in endosperm of shrunken-1 and brittle-2 maize kernels grown *in vitro*. **Crop Science**, Madison, v.36, p.947-954, 1996.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

INGLE, J.; BEITZ, D.S.; HAGEMAN, R.H. Changes in composition during development and maturation of maize seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.40, p.832-835, 1965.

JONES, R.J.; SETTER, T.L. Hormonal regulation of early kernel development. In: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.). **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.25-42. (Special Publication, 29).

KINIRY, J.R. et al. Seed weight response to decreased seed number in maize. **Agronomy Journal**, v.54, p.98-102, 1990.

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

MOZAFAR, A. Kernel abortion and distribution of mineral elements along the maize ear. **Agronomy Journal**, Madison, v.82, p.511-414, 1990.

NAIK, M.S. et al. Nitrate assimilation - Its regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.21, p.495-504, 1982.

OTEGUI, M. E.; ANDRADE, F.H. New relationships between light interception, ear growth, and Kernel set in maize. In: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.). **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.89-102. (Special Publication, 29).

RITCHIE J.T.; WEI, J. Models of kernel number in maize. In: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.). **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.75-88. (Special Publication, 29).

SETTER, T.L., FLANNIGAN, B.A. Sugar and starch redistribution in maize response to shade and ear temperature treatment. **Crop Science**, Madison, v.26, p.575-579, 1986.

SINGLETARY, G.W.; BELOW, F.E. Growth and composition of maize kernels cultured *in vitro* with varying supplies of carbon and nitrogen. **Plant Physiology**, Rockville, v.89, p.341-346, 1989.

SINGLETARY, G.W.; BELOW, F.E. Nitrogen induced changes in growth and metabolism of developing maize kernels grown *in vitro*. **Plant Physiology**, Rockville, v.92, p.160-167, 1990.

SINGLETARY, G.W. et al. Response of enzymes and storage proteins of maize endosperm to nitrogen supply. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, p.858-864, 1990.

SMICIKLAS, K.D.; BELOW, F.E. Influence of heterotic pattern on nitrogen use and yield of maize. **Maydica**, Bergamo, v.35, p. 209-213, 1990.

SWANK, J.C. et al. Interaction of carbon and nitrogen metabolism in the productivity of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.70, p.1185-1190, 1982.

TOIT, A.S.; PRINSLOO, M.A. Incorporating prolificacy into CERES-Maize prediction of kernel numbers. In: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.). **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.103-114. (Special Publication, 29).

TOLLENAAR, M. et al. (Ed.). **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.115-130. (Special Publication, 29).

TSAI, C.Y. et al. Interactions between the kernel sink, grain yield and protein nutritional quality of maize. **Journal Science Food Agricultural**, London, v.34, p.255-263, 1983.

WATANABE, M.; HAYASHI, M.; SUGIYAMA, T. Effects of supplemental nitrate application on activity of some nitrogen assimilation enzymes and leaf tissue productivity in maize seedlings. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokyo, v.31, p.573-580, 1985.

WYSS, C.S.; CZYZEWICZ, J.R.; BELOW, F.E. Source-sink control of grain composition in maize strains divergently selected for protein concentration. **Crop Science**, Madison, v.31, p.761-766, 1991.

ZINSELMEIER, C. et al. Carbohydrate metabolism in setting and aborting maize ovaries. In: WESTGATE, M.E.; BOOTE, K. (Ed.). **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, 2000. p.1-14. (Special Publication, 29).

CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1

ALTERAÇÕES DA PROPORÇÃO FONTE-DRENO E SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO DO NITROGÊNIO E O DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE MILHO⁽¹⁾

Cesar José da Silva⁽²⁾, Uilson Fernando Matter⁽³⁾ e Jairo Osvaldo Cazetta⁽⁴⁾

Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal –SP, 14884-900, Brasil.

RESUMO: Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes proporções fonte/dreno de fotoassimilados sobre o metabolismo do nitrogênio e desenvolvimento das folhas, colmos e grãos das plantas de milho, conduziu-se um experimento a campo, onde plantas com polinização de todos os estigmas foram submetidas ao desfolhamento de 100% (0/100), 66% (33/100) e 33% (66/100) enquanto que plantas com todas as folhas tiveram 0% (100/0), 25% (100/25) e 50% (100/50) dos estigmas polinizados e um tratamento controle, plantas com 100% das folhas e polinização de 100% dos estigmas (100/100). Aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (DAP) avaliou-se o teor de N-total, N-nitrato e N- Aminoácidos livres nas folhas, colmos e endospermas; a atividade da redutase do nitrato (RN) nas folhas e a massa seca de folhas e colmos. Ao final do ciclo da cultura avaliou-se a produção de grãos. Houve acúmulo de N-total nos colmos e grãos das plantas dos tratamentos 0/100, 100/0, 100/25 e 100/50.

1. Projeto financiado pela FAPESP, processo nº 00/06235-0.

2. Eng. Agr., Mest. Produção Vegetal -FCAVJ–UNESP – Bolsista FAPESP processo nº 99/12126-0 E-mail: silvacj@fcav.unesp.br

3. Eng. Agr., Mestrando Prod. Vegetal - FCAVJ – UNESP – Bolsista FAPESP processo nº 99/12125-3 E-mail: ufmatter@fcav.unesp.br

4. Eng. Agr. Dr. Professor Adjunto – FCAVJ-UNESP-E-mail: cazetta@fcav.unesp.br

O teor de N-nitrato não diferiu nas folhas e grãos remanescentes nas plantas, aumentando somente nos colmos de plantas com 0, 33 e 66% de folhas. As limitações tanto de fonte quanto de dreno induziram o aumento no teor de aminoácidos livres nas folhas, colmos e grãos sendo que quanto menor o número de folhas ou de grãos maior foi o acúmulo. Os tratamentos não afetaram a atividade da redutase do nitrato nas folhas. A menor proporção de grãos promoveu acúmulo de massa seca nas folhas, enquanto que a redução no número de folhas causou redução na massa seca de colmos. A retirada de 100% das folhas fez com que as plantas secassem e a espiga deteriorasse após 10 DAP, não produzindo grãos. As plantas com redução de 66 e 33% do número de folhas reduziram a produção de grãos em 58 e 20%, respectivamente e a redução de 73 e 50% na polinização de grãos teve produção de 17 e 48% respectivamente, quando comparados ao controle.

TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO: Nitrato, redutase do nitrato, relação fonte/dreno, aminoácidos livres, produção de milho.

SOURCE-SINK RELATIONSHIP ALTERATION AND ITS EFFECT ON THE NITROGEN METABOLISM AND THE DEVELOPMENT OF MAIZE PLANTS

ABSTRACT: With the objective of evaluating the effect of different proportions photoassimilated source/sink on the metabolism of the nitrogen and development of the leaves, stems and grains of the corn plants, he behaved an experiment to field, where you plant with pollination of all the stigmata they were submitted to the defoliation of 100% (0/100), 66% (33/100) and 33% (66/100) while you plant with all the leaves they had 0% (100/0), 25% (100/25) and 50% (100/50) of the pollinated stigmata and a treatment controls, plants with 100% of the leaves and pollination of 100% of the stigmata (100/100). N-total, N-nitrate, N-free amino acids levels were evaluated in leaves, stalks and endosperm. Nitrate reductase (NR) activity in leaves, the dry matter of leaves and stalks on the two, ten, twentieth and thirtieth days after pollination and the final yield of grains were also evaluated. N-total was accumulated on stalks and grains

of plants under treatments 2, 5, 6, and 7. No difference in the nitrate content was observed in leaves and grains, however, nitrate accumulated on stalks of plants with 0%, 33% and 66% of leaves. The concentration of free amino acids on leaves, stalks and grains was induced by the source, as well as by leaf reduction. The higher the reduction the leaves and grains the higher the amino acid accumulation. The nitrate reductase activity on leaves was not affected by the treatments. The grain reduction increased leaf dry matter and decreased stalk dry matter. Few days after removing all leaves the plants died, there was ear deterioration and no grain production was observed. The reduction of leaf area in 66 and 33% decreased 58 and 20% the grain production. Grain reduction of 73 and 50% caused yield of 17 and 48%, when compared to the control plants.

ADDITIONAL INDEX TERMS: nitrate, nitrate reductase, source/sink relationship, free amino acids, maize yield.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio desempenha papel fundamental na manutenção da atividade metabólica da folha (fonte de fotoassimilados), como também na dos grãos (principal dreno de fotoassimilados) que, em conjunto determinam o estabelecimento, a formação inicial e o ritmo de enchimento dos grãos (BELOW et al, 1981; SINGLENTARY et al, 1990; FALEIROS et al. 1996; CAZETTA et al. 1999). A perda de área foliar afeta os componentes do rendimento em decorrência das alterações provocadas na atividade fisiológica (fonte-demanda) das plantas, refletindo finalmente na produtividade da cultura (MOURA, 1999). Por outro lado, a redução do número de grãos certamente diminui a demanda por fotoassimilados e minerais acumulando nas folhas e raízes, e existem evidências de que este fato causa redução na taxa fotossintética e induz a senescência da planta (CHISTENSEN et al., 1981; RAJACN & TOLLENNAR, 1999).

O metabolismo do nitrogênio, por sua vez, depende de vários fatores como absorção, transporte e distribuição dentro da planta e das células, bem como da

assimilação bioquímica, fatores estes cuja eficiência, isoladamente ou no conjunto, controlam a produção (CAZETTA, 1997). A assimilação do nitrogênio está intimamente relacionada com as reações da fotossíntese e metabolismo de carboidratos, tanto pela necessidade de energia para redução do nitrato à amônia, como também pelo fornecimento de cadeias carbônicas necessárias para a incorporação de amônia e a formação dos aminoácidos (NAIK et al., 1982; WATANABE et al., 1985). Segundo SEEMANN et al. (1987), esses dois processos são estreitamente interligados, pois a energia necessária para a assimilação do nitrogênio deriva direta ou indiretamente da fotossíntese e a capacidade fotossintética, por sua vez, depende do nitrogênio, pois grande parte do nitrogênio das folhas está alocado nas proteínas envolvidas no processo fotossintético.

Segundo BEEVERS e HAGEMAN (1969), a redutase do nitrato é a primeira das várias enzimas envolvidas nesse processo, sendo considerada o passo limitante na incorporação do nitrogênio mineral em compostos orgânicos, tendo sugerido que esta enzima está relacionada com a produtividade do milho. A redutase do nitrato é considerada também uma enzima chave na regulação do metabolismo do N, já que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a NH_4^+ antes de ser incorporado em compostos orgânicos no sistema radicular ou na parte aérea (PURCINO et al., 1994; CARELLI et al., 1996).

Uma vez incorporado às plantas o N-orgânico, por sua vez, encontra-se em equilíbrio dinâmico, sendo continuamente desdobradas e sintetizadas substâncias nitrogenadas, o que permite o acúmulo e translocação de N em diferentes órgãos, dependendo da fase de desenvolvimento ou estresse a que a planta está sendo submetida (MALAVOLTA, 1979). Dentro desse aspecto, existem evidências de que o caule das plantas de milho funciona alternativamente como órgão de importação e exportação de compostos nitrogenados durante o desenvolvimento da planta e que, dependendo das condições fotossintéticas, do manejo e da demanda pelos demais órgãos, boa parte dos fotossintatos necessária para o desenvolvimento dos grãos em formação pode vir do caule e não apenas da fotossíntese que está sendo realizada naquela fase (SETTER e FLANNIGAN, 1986; TA et al., 1993).

Baseado no exposto acima, conduziu-se este trabalho para estudar o efeito das alterações da proporção de folhas e grãos sobre o metabolismo do nitrogênio e desenvolvimento das folhas e colmos, bem como na produção de grãos de plantas de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Conduziu-se o experimento na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal – UNESP, num latossolo roxo com as características químicas apresentadas no quadro 1.

Quadro 1. Análise Química do solo

pH em CaCl ₂	M.O. g/dm ³	P (resina) mg/dm ³	K -----	Ca	Mg mmol _c /dm ³	H+Al -----	SB	T	V %
5,3	29	53	4,2	45	18	38	67,2	105,2	64

Nesta área, preparada no sistema de plantio convencional, cultivou-se o milho híbrido simples, super precoce e com baixa prolificidade “Agromen 3050”, plantado no espaçamento de 0,9m entre linhas e 20 cm entre plantas, adubado conforme recomendação para a cultura no estado de São Paulo (FORNASIERI FILHO, 1992). O experimento constou de sete tratamentos: 1) Plantas com 100% das folhas e polinização de todos os grãos (controle) (100/100); 2) retirada de todas as folhas, com polinização de 100% dos grãos (0/100); 3) retirada de dois terços das folhas, com polinização de 100% dos grãos (33/100); 4) retirada de um terços das folhas, com polinização de 100% dos grãos (66/100); 5) sem retirada de folhas, com polinização de 0% dos grãos (100/0); 6) sem retirada de folhas, com polinização de 27% dos grãos (100/27) e 7) sem retirada de folhas, com polinização de 50% dos grãos (100/50), aplicados na fase de pendoamento da cultura. Inicialmente, pretendia-se ter 33 e 66% de dreno, porém, em função da impossibilidade de controlar perfeitamente a polinização, obteve-se somente 25 e 50%, respectivamente. O experimento foi disposto

em blocos casualizados com quatro repetições totalizando 28 parcelas de 63 m² de área útil com 1 metro de bordadura.

Para controlar a proporção de folhas manteve-se um número de folhas correspondente à percentagem de cada tratamento, sendo essas distribuídas uniformemente na planta, a folha da espiga sempre foi mantida, pois foi a folha prevista para ser submetida às análises laboratoriais. A proporção de grãos foi estabelecida através da polinização controlada dos estigmas da espiga. Em plantas com 100 % de grãos, após a polinização artificial as espigas foram mantidas expostas para garantir que o máximo dos estigmas fosse polinizado.

Aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização coletaram-se 10 plantas por parcela, foram separados os colmos, folhas e espigas, que foram secos em estufa a 65 – 70°C até massa constante para a determinação da massa seca. Das dez plantas coletadas em cada parcela retiraram-se amostras de folhas e colmos na altura da inserção da espiga, bem como grãos do terço médio da espiga, imediatamente após o corte das plantas. Este material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo posteriormente liofilizado até massa constante, separado o endosperma dos grãos, moído finamente na presença de nitrogênio líquido e armazenado em freezer a –65 °C, material este utilizado para a determinação de N-total, N-nitrato e aminoácidos livres totais.

A atividade da redutase do nitrato foi determinada coletando-se 10 folhas vizinhas da espiga, pelo método *in vivo* de acordo com JAWORSKI (1971). Do limbo foliar das folhas, coletadas entre 8:00 e 10:00 horas, com o auxílio de um furador de rolhas, retiraram-se 20 discos de 1cm de diâmetro, os quais foram colocados em frasco escuro, na presença de 10 ml do meio de incubação (Tampão fosfato 100 mM pH 7,2; KNO₃ 50 mM; N- propanol 1% (v/v); Triton X-100 0,1% (v/v), submetidos à infiltração a vácuo por três minutos e em seguida incubado durante 1 hora em banho maria a 30° C. Após a incubação adicionou-se 1 mL de uma solução de sulfanilamida 1% em HCl 3 N, para paralisar a atividade enzimática. A seguir, determinou-se o teor de nitrito conforme método proposto por NICHOLAS et al. (1976).

A determinação de metabólitos em folhas, caules e grãos, foi realizada em extratos preparados de acordo com as indicações de HENDRIX (1993): Incubou-se, 50

mg de amostra, com 1,5 mL de etanol 80%, em banho maria a 60°C durante 30 minutos, centrifugou-se a 1200 g por 20 minutos, retirando-se o sobrenadante. Repetiu-se esta operação quatro vezes, juntou-se todos os sobrenadantes retirados após centrifugação, completou-se o volume para 14 mL com água desionizada.

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método semi-micro Kjeldhall, seguindo as indicações de HEBERER et al. (1985) e FALEIROS et al. (1996). O N-nitrato foi determinado no extrato, pela metodologia descrita por CATALDO et al. (1975) e o teor de aminoácidos livres totais foi determinado conforme descrito em MOORE (1968).

Os resultados das avaliações foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, segundo indicações de BANZATO e KRONKA (1992). Para as análises estatísticas utilizou-se o programa ESTAT- Sistema para Análises Estatísticas (V. 2.0), desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas e Pólo Computacional da FCAV-Unesp - Jaboticabal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de N-total nas folhas ficou em torno de 33,5 mg.grama de MS⁻¹, com pequenas variações entre os diferentes tratamentos (figura 1). Observa-se ainda que houve redução significativa do teor de N-total na folha somente aos 30 DAP quando as plantas já iniciavam o processo de maturidade fisiológica, iniciando o processo de senescência.

Quando se avaliou o N-total nos colmos observou-se que plantas com relação folha/grão de 0/100 apresentaram os maiores teores, seguidas das 100/0 (figura 2). Notou-se, no entanto, que o teor de N-total no colmo, apresentou um aumento à medida que se limitou a fonte ou o dreno mais drasticamente. Comparando-se as avaliações observa-se que as plantas dos tratamentos 100/100, 33/100, 66/100, 100/25 e 100/50 tiveram o teor de N-total no colmo reduzido linearmente dos 2 aos 30 DAP.

A redução do número de grãos por espiga promoveu acúmulos de N-total nos grãos remanescentes, sendo que quanto menor o número de grãos, tanto maior o teor de N-total nos endospermas, tanto aos 20 quanto aos 30 DAP (figura 3).

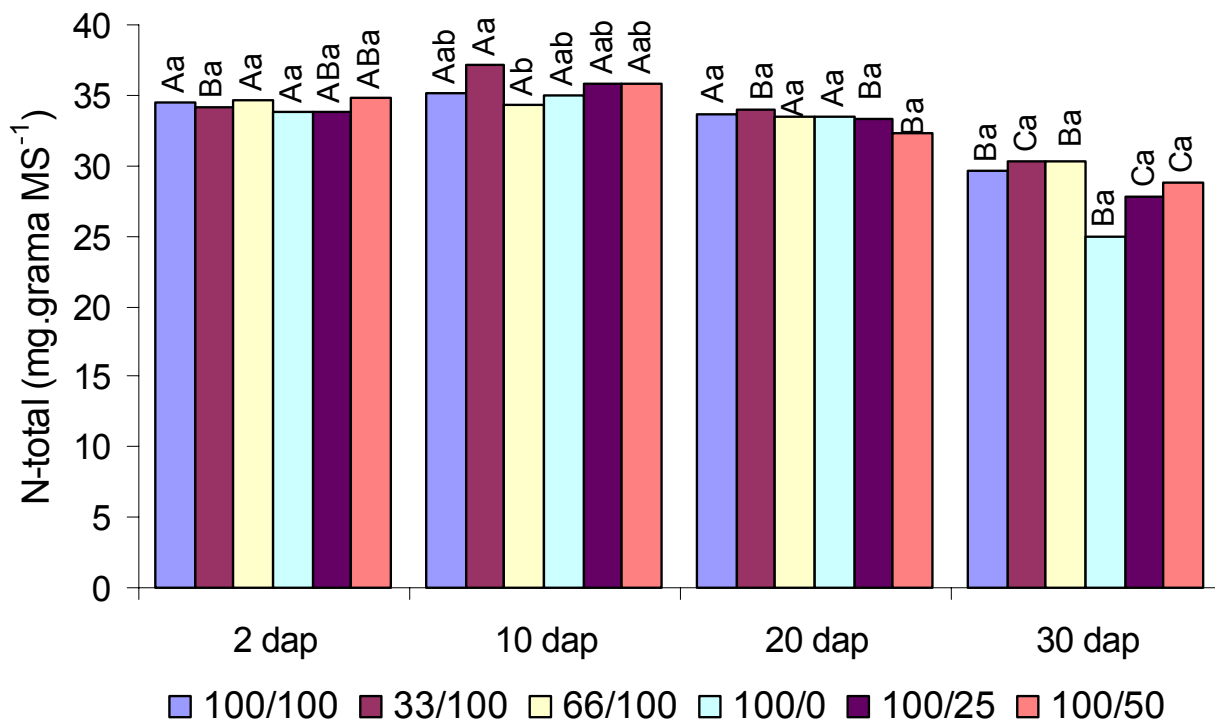


Figura 1. Teor de Nitrogênio Total nas folhas das plantas de milho, aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 3,30 e 3,92 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de N-nitrato nas folhas foi semelhante em todos os tratamentos aos 2, 10 e 20 DAP (figura 4), apresentando aumento significativo em todos os tratamentos dos 20 aos 30 DAP, sendo que nesta avaliação os tratamentos 100/0 e 100/25, se destacaram no acúmulo de N-nitrato por unidade de massa seca.

Nos grãos o teor de N-nitrato foi significativamente superior aos 10 DAP, caindo gradativamente até os 30 DAP, sendo que aos 20 e 30 DAP os tratamentos não diferiram entre si (figura 5). Aos 10 DAP plantas dos tratamentos 33/100 e 66/100 apresentaram maior teor de N-nitrato nos endospermas.

A elevação da concentração de N-total nos grãos das plantas dos tratamentos 100/25 e 100/50 sem acúmulo de N-nitrato indica que o N nos endospermas desses tratamentos estava predominantemente na forma de N-reduzido.

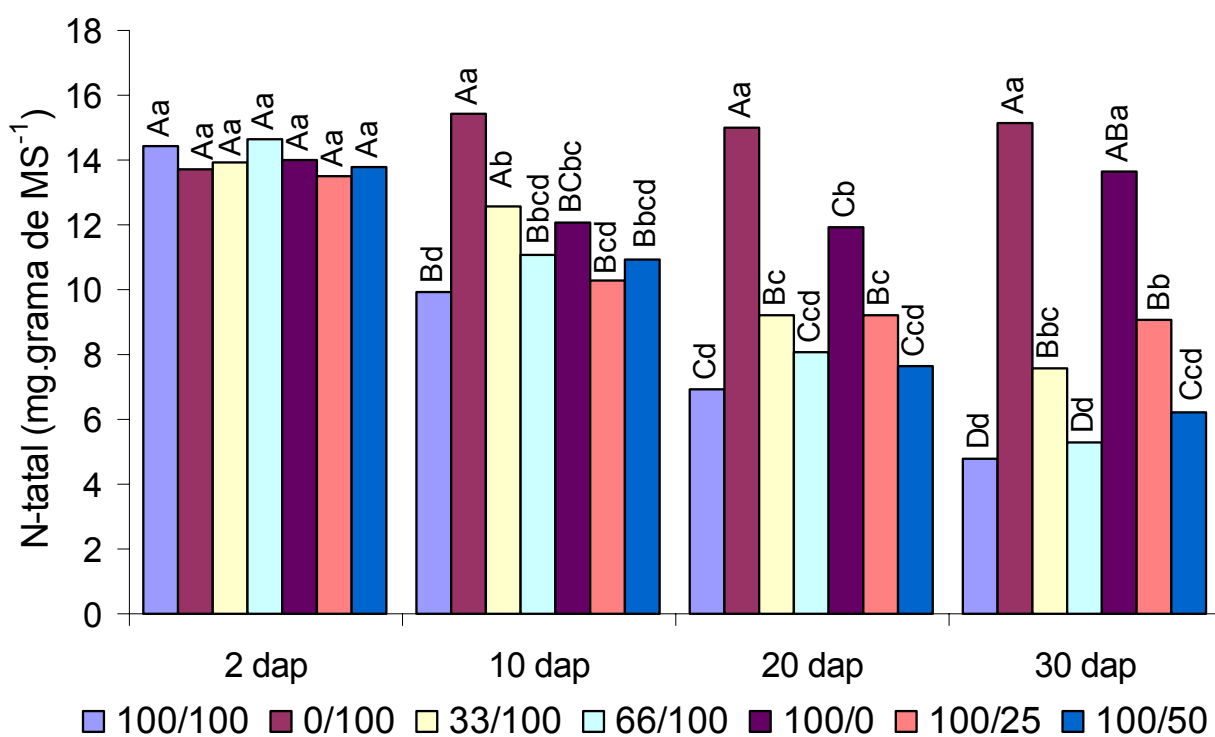


Figura 2. Teor de Nitrogênio Total nos colmos das plantas de milho, aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 9,26 e 8,26 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aparentemente a limitação do metabolismo do N está nas folhas, pois, houve acúmulo de N-nitrato apenas no colmo das plantas que tiveram limitação de fonte, efeito este visualizado a partir dos 10 DAP (figura 6). Entretanto, as alterações nas proporções relativas folha/grão não afetaram a atividade da redutase do nitrato na folha (figura 7), indicando que a limitação do metabolismo nitrogenado não deve estar nesta enzima.

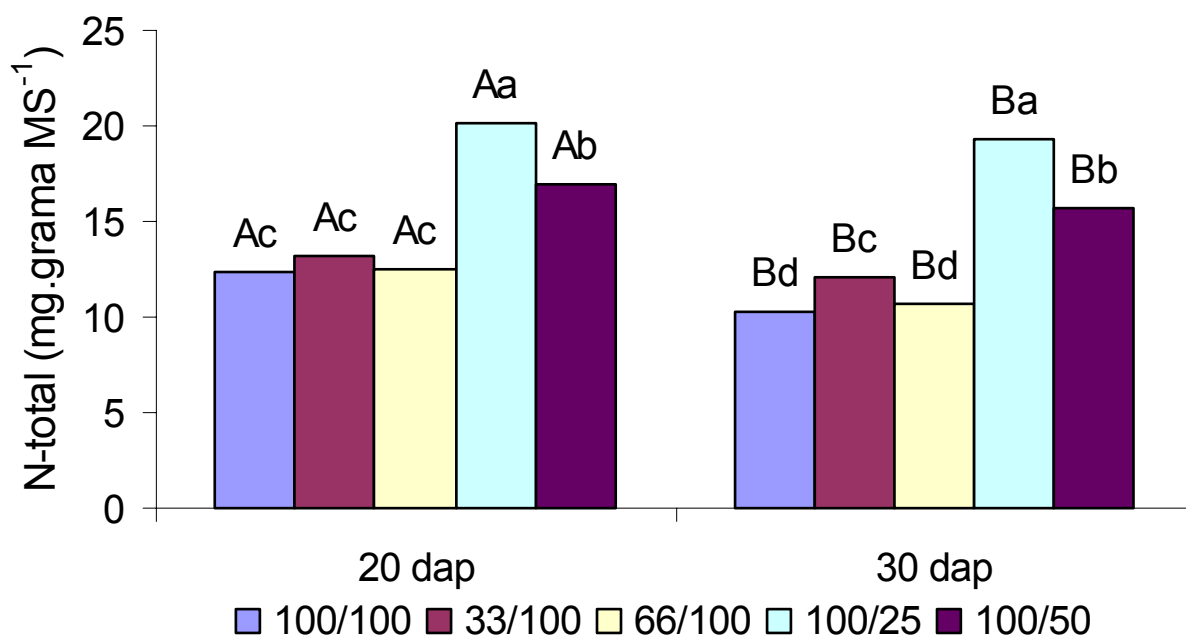


Figura 3. Teor de Nitrogênio Total no endosperma de grãos de milho aos 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 6,40 e 6,44 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ocorreu aumento significativo da concentração de aminoácidos livres nas folhas somente nas plantas do tratamento 100/0 e a partir dos 20 DAP (figura 8). Plantas sem folhas (0/100), sem grãos (100/0) e com 25% grãos (100/25), tiveram elevações

expressivas no teor de aminoácidos livres totais no colmo a partir dos 10 DAP (figura 9), enquanto que o teor nos colmos das plantas dos demais tratamentos reduziu progressivamente dos 2 aos 30 DAP. Por outro lado o acúmulo de aminoácidos livres nos grãos só ocorreu em plantas sem folhas, a partir dos 20 DAP (figura 10), enquanto que nos demais tratamentos os teores de N-aminoácidos nos endospermas reduziu significativamente dos 10 aos 30 DAP, não havendo diferenças entre os tratamentos.

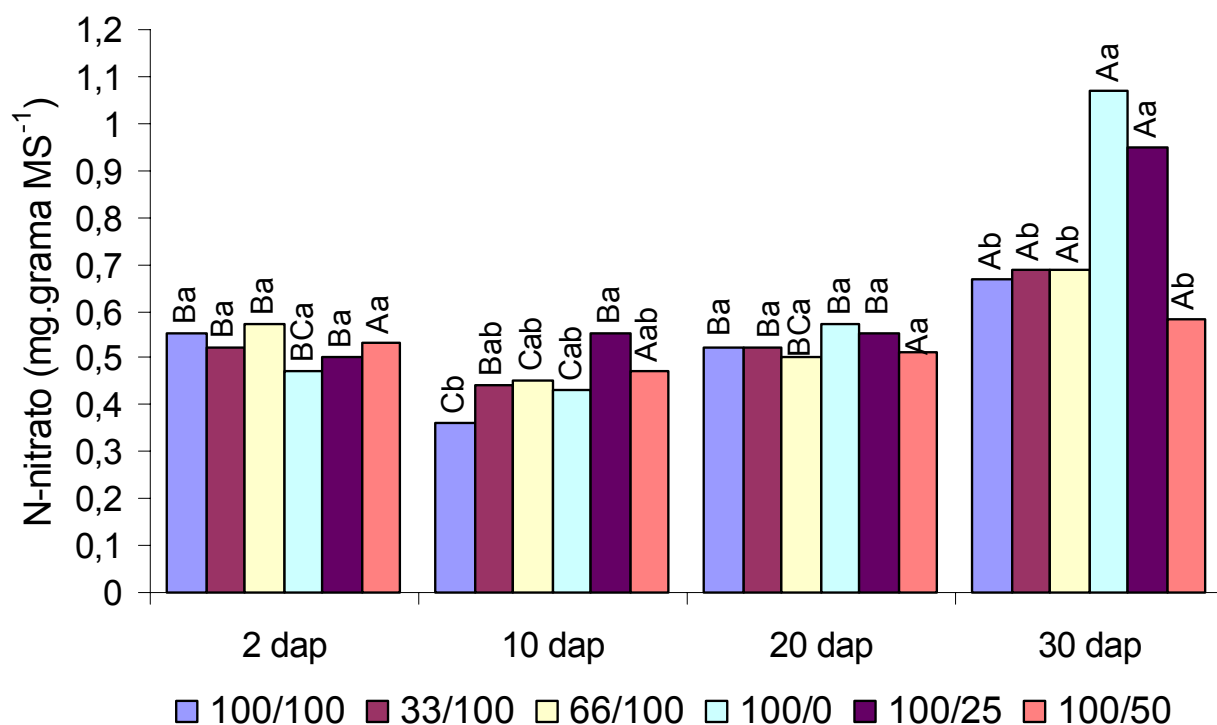


Figura 4. Teor de N-nitrato nas folhas das plantas de milho, aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 12,10 e 10,30 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Através da figura 11 observa-se que ocorreu maior acúmulo de massa seca em folhas quando houve limitação de dreno, sendo que quanto menor o número de grãos na espiga maior o acúmulo de MS nas folhas, efeito observado apenas aos 30 DAP. Verificou-se ainda redução significativa da massa seca de colmos em plantas com limitação de fonte e aumento significativo na massa seca de colmos em plantas com limitação de dreno, efeito que ficou bem evidente aos 30 DAP (figura 12).

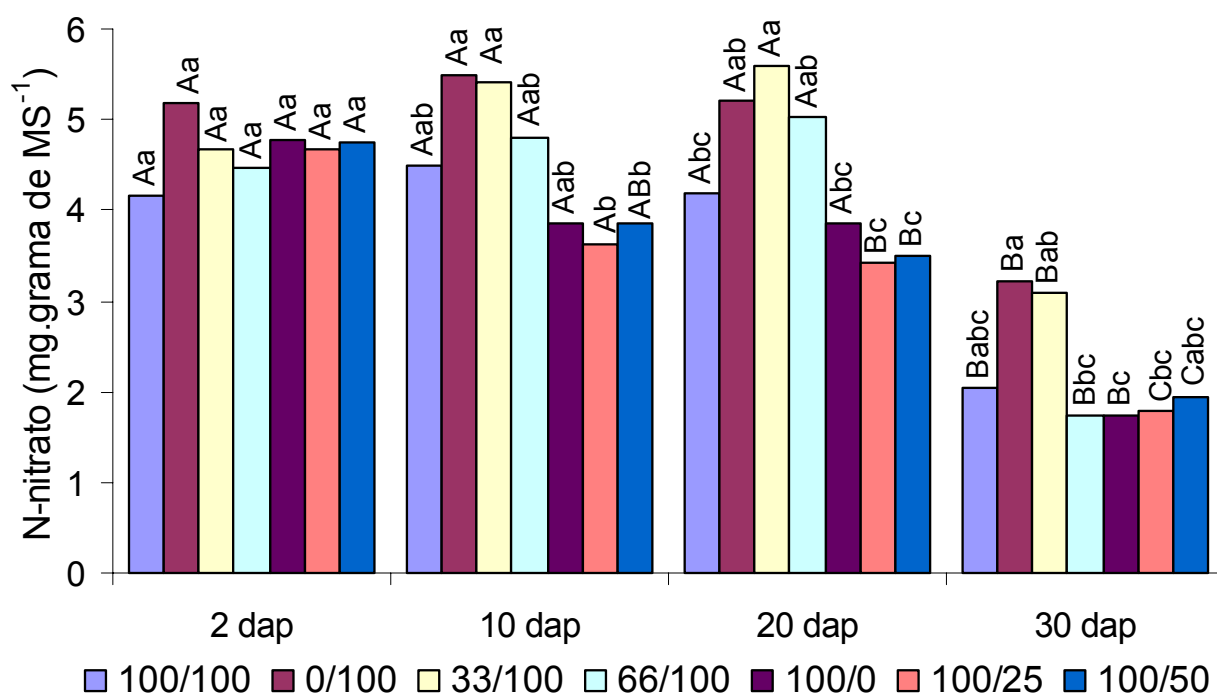


Figura 5. Teor de N-nitrato nos colmos das plantas de milho, aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 15,64 e 16,22 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

À medida que foi imposta uma diminuição na proporção de fonte ou de dreno, também a produção de grãos por planta foi reduzida, e quanto mais drástico o tratamento maior a redução (figura 13).

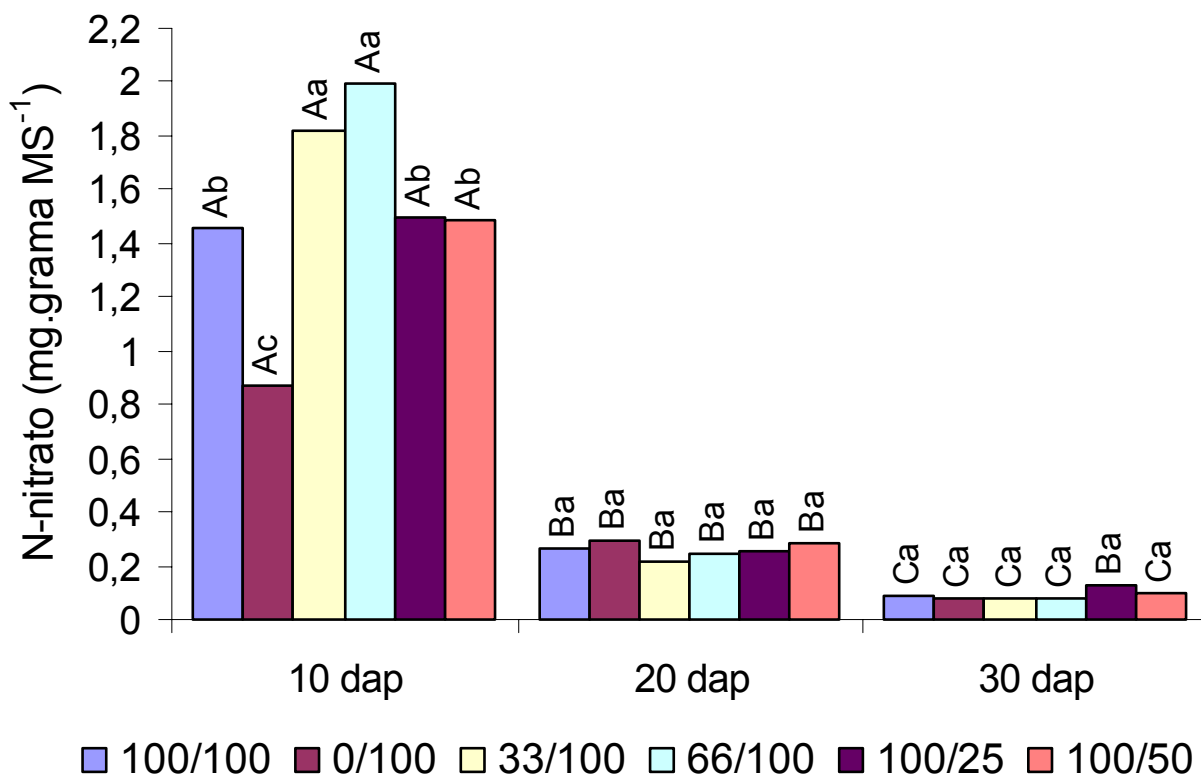


Figura 6. Teor de N-nitrato no endosperma de grãos de milho aos 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 18,74 e 14,28 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De forma geral, observa-se que o desfolhamento parcial ou a redução do dreno, não interferiram no acúmulo de N nas folhas. O colmo destacou-se como grande depósito de N em plantas com redução de fonte e dreno de fotoassimilados, porém,

ocorreu acúmulo de N nos grãos dos tratamentos com 27 e 50% de grão, que pode ser justificado pelo fato do grão ser o principal dreno na fase reprodutiva, e quando houve menor número de grãos na espiga a tendência foi a de acumular mais nos remanescentes. Below et al. (1981), justificaram que o acúmulo de N em plantas que têm o desenvolvimento da espiga reduzido tende a ocorrer porque a planta passa por um período de grande atividade metabólica antes da antese, acumulando N e carboidratos nas folhas e colmos, para promover um crescimento da espiga e enchimento dos grãos, já que a redução do N é limitada nesta fase da cultura.

Outro aspecto a ser ressaltado é que a análise do teor de N-total não permitiu concluir se o acúmulo de N nas diferentes partes da planta analisadas foi em função do aumento de nitrato absorvido pelas raízes, ou do aumento de metabólitos sintetizados na planta a partir deste.

Ao se avaliar o teor de N-nitrato nas diferentes partes das plantas, observou-se que plantas com limitação de fonte acumularam mais nitrato no colmo, devido ao fato de que nas condições de clima, solo e fonte de adubo utilizada, esta provavelmente foi a forma absorvida predominantemente pelo sistema radicular.

Outro fator que deve ter contribuído para este acúmulo foi a falta de poder redutor (fotossíntese) para fazer a passagem de N-nitrato para N-reduzido, já que a atividade da redutase do nitrato não foi afetada, pois segundo REED et al. (1980), a capacidade de um genótipo de milho em acumular N-reduzido nas partes vegetativas é dependente do suprimento de nitrato, atividade da nitrato redutase e suprimento de carboidratos. Plantas com redução de dreno não tiveram tais limitações, tanto que não houve acúmulo diferenciado de nitrato em nenhuma das partes estudadas.

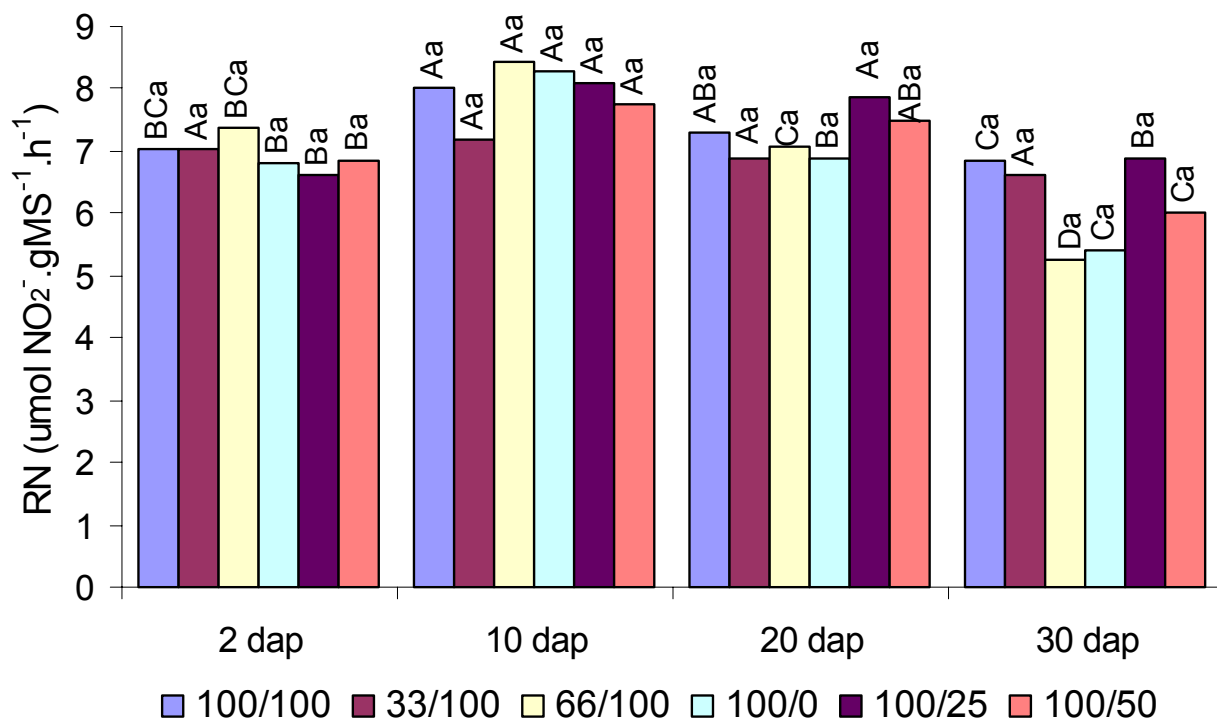


Figura 7. Atividade da enzima Redutase do Nitrato nas folhas das plantas de milho, aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 11,55 e 14,14 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

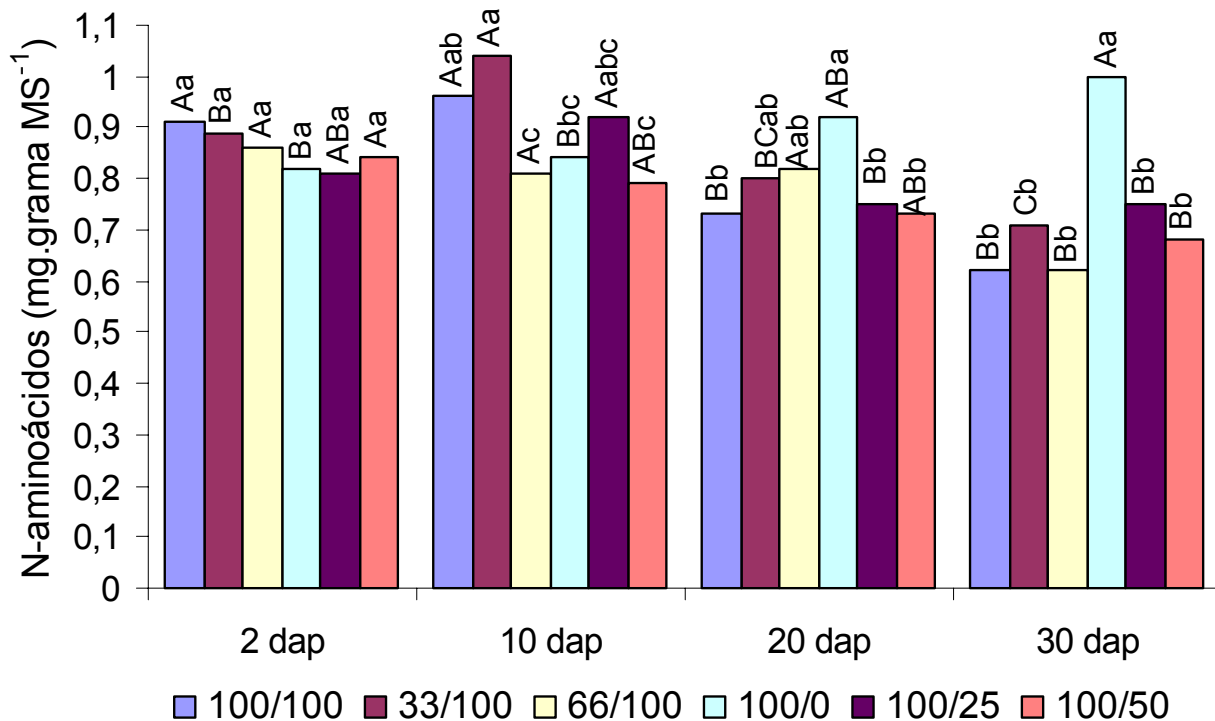


Figura 8. Teor de aminoácidos livres nas folhas das plantas de milho, aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 8,31 e 8,27 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

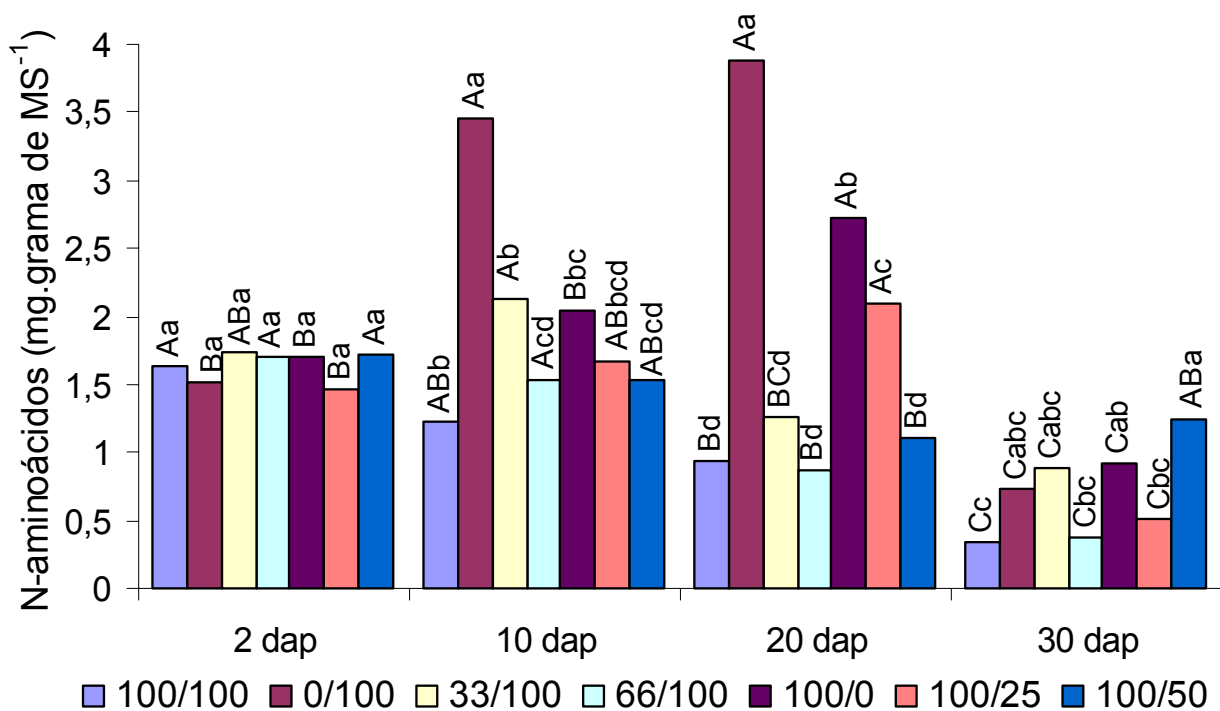


Figura 9. Teor de aminoácidos livres nos colmos das plantas de milho, aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 16,39 e 17,35 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

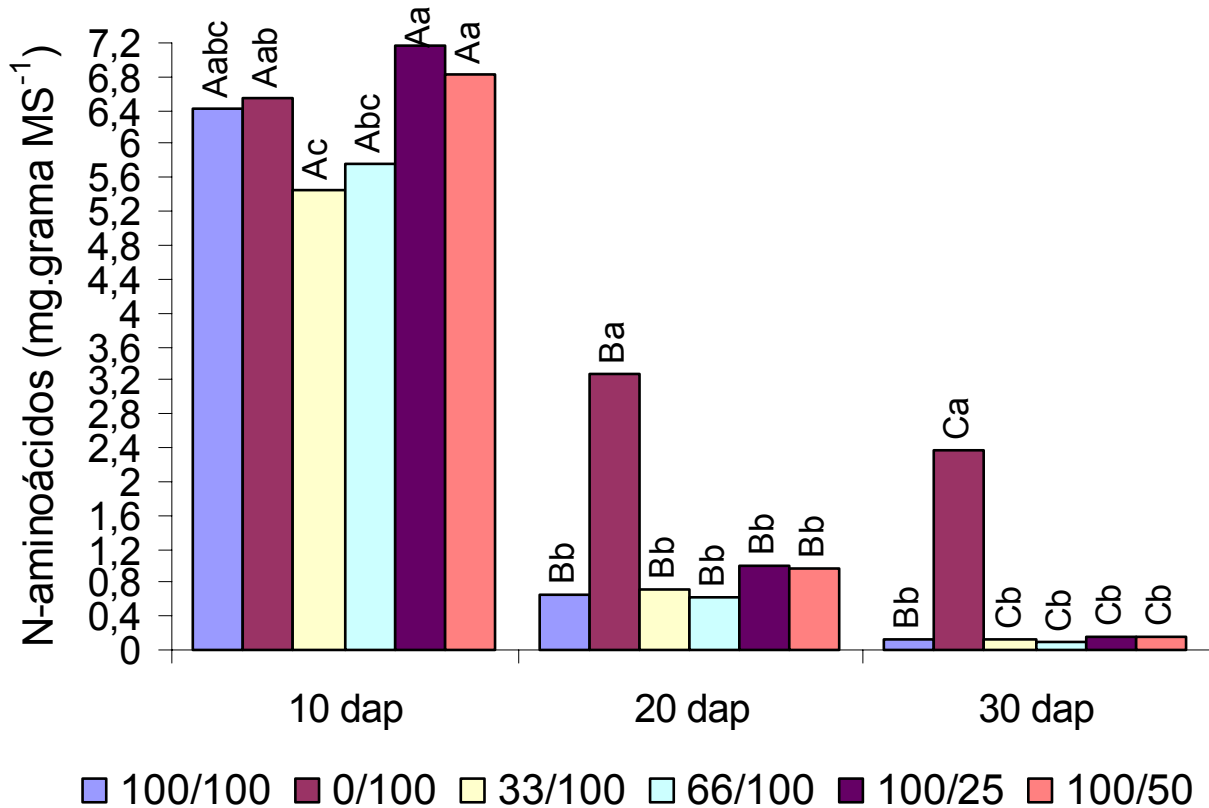


Figura 10. Teor de aminoácidos livres no endosperma de grãos de milho aos 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 14,25 e 19,11 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O fator que levou a aumentar o teor de nitrato no colmo das plantas ficou mais evidente quando se analisou a atividade da redutase do nitrato na folha. Observou-se que, tal enzima não foi estimulada independentemente do tratamento aplicado. Entretanto, deve-se levar em conta que plantas com menos folhas devem ter reduzido menos nitrato, pois além da indução pelo substrato a atividade enzimática é influenciada pela área foliar, luz, temperatura e ainda pode haver um controle por “feed

back” quando ocorre o acúmulo de formas reduzidas de N (FERNANDES e FREIRE (1976).

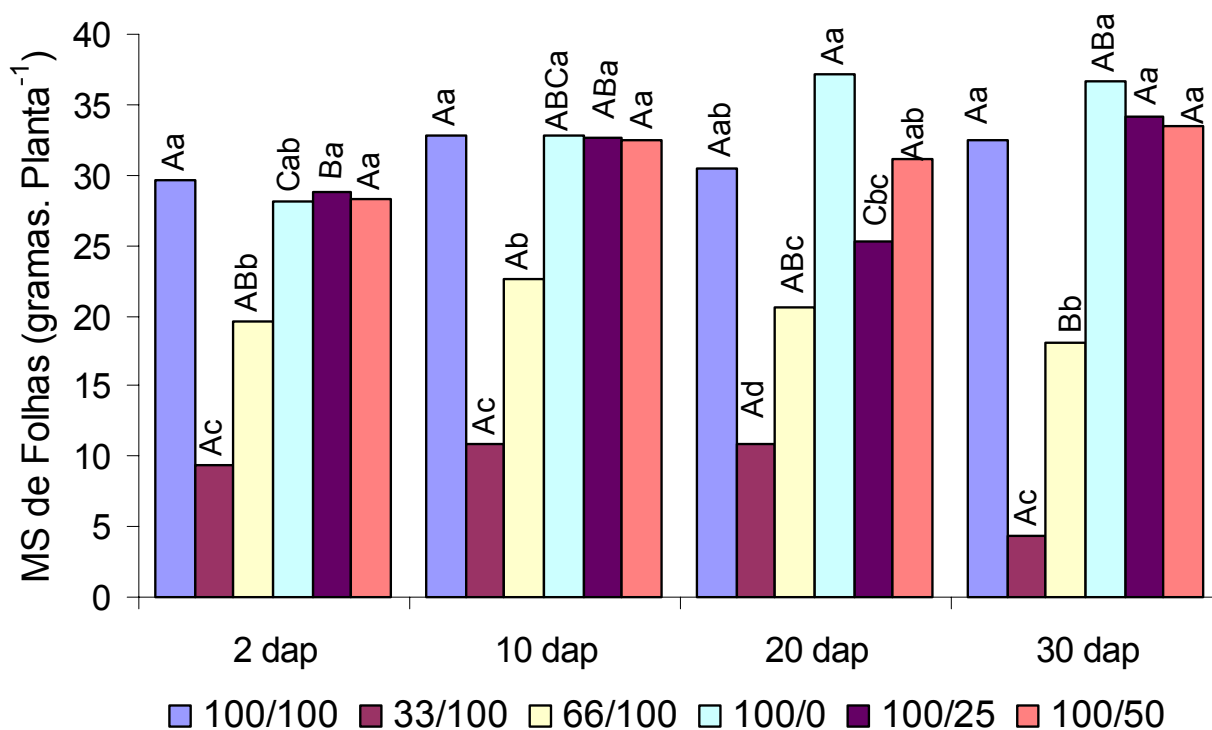


Figura 11. Massa seca de folhas, total por planta aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, onde coletou-se 10 plantas, apresentando C.V. de 16,49 e 11,09% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Provavelmente não ocorreu controle pelo acúmulo de formas reduzidas de N, ou pelo produto final da reação catalisada pela redutase do nitrato na atividade enzimática, conforme sugerido por FERNANDES e FREIRE (1976) em trabalho similar, pois aumentos significativos do teor de aminoácidos livres na folha não suprimiram a atividade enzimática.

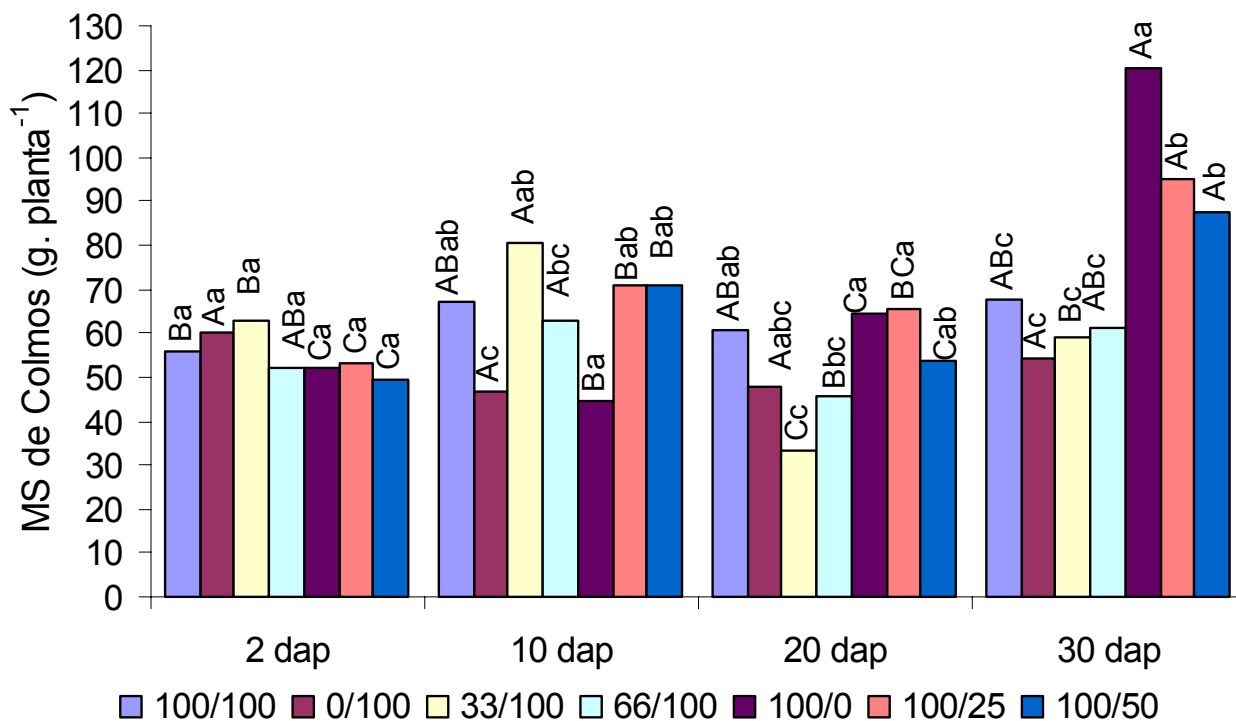


Figura 12. Massa seca de colmos, total por planta aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, onde coletou-se 10 plantas, apresentando C.V. de 14,21 e 12,61% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Plantas com redução de dreno, principalmente os tratamentos 5 (100/0) e 6 (100/25), acumularam mais aminoácidos no colmo e grãos, provavelmente pela degradação das proteínas existentes nesses órgãos, uma vez que sem grãos a planta teve que degradar compostos mais complexos que se acumularam nas folhas, pois segundo CHISTENSEN et al. (1981), o acúmulo de aminoácidos livres nas diferentes partes da planta parece derivar da redução do nitrato ou da hidrólise de proteínas. Isto ficou mais evidente quando se comparou a porcentagem de N-amino e N-proteico no N-

reduzido total. No tratamento 5 (100/0), cerca de 39% do N reduzido total foi composto por aminoácidos livres, enquanto que em plantas do tratamento testemunha (100/100), esse valor foi cerca de 33%, demonstrando que parte das proteínas podem ter sido degradadas. Estes dados concordam com CHRISTENSEN et al. (1981), que atribuíram o aumento do teor de aminoácidos livres em folhas de plantas de milho que tiveram sua espiga arrancada, ao aumento da atividade de proteases na folha e conseqüentemente redução do teor de proteínas.

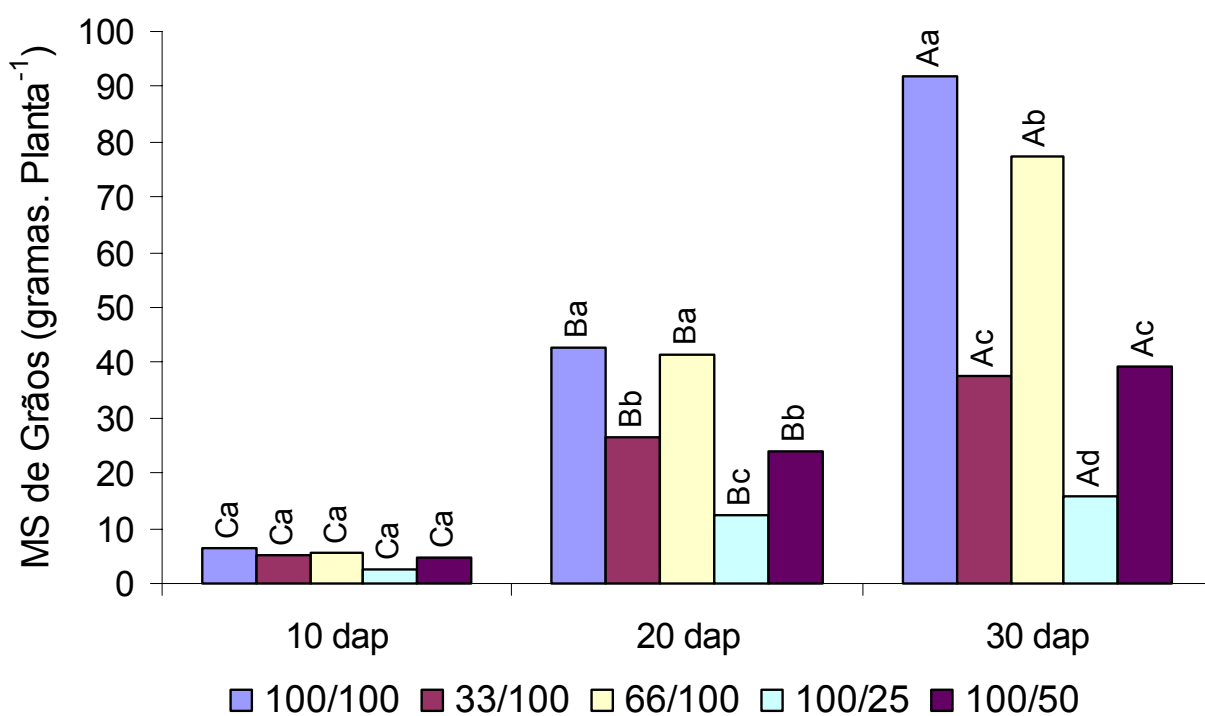


Figura 13. Massa seca de grãos por planta, aos 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 14,29 e 11,96 para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Plantas sem folhas, por sua vez, apresentaram elevação no nível de aminoácidos livres no colmo e grãos, pois estes órgãos visivelmente entraram em processo de deterioração, o que deve ter levado a degradação de compostos mais complexos. Notou-se, ainda, que em plantas com 33% de folhas não houve acúmulo de aminoácidos livres no grão, indicando que quatro folhas por planta foram suficientes para fazer com que o metabolismo do nitrogênio tivesse continuidade, embora o comprometimento da área fotossintética tenha influenciado significativamente no crescimento da planta e na produção de grãos.

Plantas que sofreram redução de dreno apresentaram aumentos significativos na massa seca de folhas, sendo este tanto maior quanto mais drástica a redução imposta no número de grãos (figura 11). Observou-se, no entanto, que 50% de grãos não permitiu que houvesse aumento de massa seca nas folhas, indicando que a quantidade de grãos restantes na espiga foi suficiente para drenar fotoassimilados das folhas, produzindo grãos maiores e mais pesados (SILVA et al., 2001).

A limitação da fonte (folha) não interferiu na massa seca das folhas remanescentes ao se comparar ao tratamento testemunha. As plantas com 33% e 66% das folhas produziram exatamente 33% e 66% da matéria seca respectivamente, indicando que nestes tratamentos não houve diferença de remobilização de metabólitos da folha para os grãos.

O colmo das plantas sofreu remobilização quando se limitou a fonte, pois plantas dos tratamentos 0/100, 33/100 e 66/100 acumularam menos massa seca no colmo até os 20 dias após a polinização (figura 12). Isto se deve ao fato de que os tratamentos foram aplicados na época da polinização, quando a planta estava demandando uma grande quantidade de fotoassimilados para a formação das espigas, e posterior enchimento de grãos, fazendo com que a diminuição da fonte (folhas) induzisse a planta a remobilizar fotoassimilados do colmo. Estes resultados estão de acordo com os de REED et al. (1988), que estudando o acúmulo de massa seca e N em plantas de milho concluíram que houve uma intensa remobilização de fotoassimilados das folhas e colmos para a espiga na fase de enchimento dos grãos em plantas com controle de fonte através de sombreamento.

A análise dos dados da figura 5 revela também que plantas com redução de dreno não apresentaram aumentos significativos de massa no colmo quando comparadas as do testemunha, aumentos estes que ocorreram nas folhas.

A retirada de 66% e 33% das folhas implicou na redução de 58 e 20% respectivamente, na produção de massa seca de grãos por planta. Estes resultados concordam com os de MAZA et al. (1999), que avaliando o efeito do desfolhamento sobre o crescimento de dois genótipos de milho, observaram que o desfolhamento apresentou maior efeito quando efetuado 50 dias após a emergência reduzindo significativamente tanto a massa seca de colmos e espigas como também de raízes. REED et al. (1980), também afirmam que a produção de grãos de milho depende do acúmulo e partição do N-reduzido acumulado durante o estágio vegetativo, havendo uma relativa contribuição da assimilação do nitrato e redistribuição do N-reduzido durante o desenvolvimento do grão, o que não ficou evidente neste trabalho, em função da desfolha das plantas.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram esclarecer que:

- A atividade da redutase do nitrato na folha não foi afetada pelas alterações nas proporções de fonte e dreno de fotossintatos.
- Os teores de N-total, N-nitrato e N-aminoácidos livres, nas folhas, colmos e endospermas foram mais intensamente afetados quanto mais drásticas foram as reduções de folhas ou grãos.
- As reduções da fonte e dreno promoveram aumentos significativos nos teores de N-total, N-nitrato e N-aminoácidos livres nas partes remanescentes analisadas.
- A ausência de grãos na espiga induziu aumento diferenciado de massa seca nas folhas.
- A massa seca dos colmos das plantas com 0, 33% e 66% de folhas reduziu 22, 45 e 25%, respectivamente.

- As reduções de 66% e 33% no número de folhas induziram, respectivamente, reduções de 58% e 20% na produção de grãos por planta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro e bolsas concedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANZATO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247p.

BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Rockville, v.20, p.495-522, 1969.

BELOW, F.E. et al. Availability of reduced N and carbohydrates for ear development of maize. **Plant Physiology**, Bethesda, v.68, p.1186-1190, 1981.

CARELLI, M.L.C. et al. Níveis de nitrogênio, metabolismo, crescimento e produção de girassol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.8, n.2, p.123-130, 1996.

CATALDO, D.A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, Monticello, v.6, p.71-80, 1975.

CAZETTA, J.O.; SEEBAUER, J.R.C.; BELOW, F.E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels growing in vitro. **Annals of Botany**, London, v.84, p.747-754, 1999.

CHRISTENSEN, L.E.; BELOW, F.E. & HAGEMAN, R.H. The effects of ear removal on senescence and metabolism of maize. **Plant Physiology**, Bethesda, v.68, p.1180-1185, 1981.

FALEIROS, R.R.S.; SEEBAUER, R.J.; BELOW, F.E. Nutritionally induced changes in endosperm of shrunken-1 and brittle-2 maize kernels grown in vitro. **Crop Science**, Madison, v.36, p.947-954, 1996.

FERNANDES, M.L.; FREIRE, L.R. Efeitos de nitrogênio nítrico aplicado ao solo na atividade de nitrato-redutase e na acumulação de N-solúvel em *Brachiaria sp.* **Turrialba**, Coronado, v.26, n.3, p.268-273, 1976.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

HEBERER, J.A.; BELOW, F.E.; HAGEMAN, R.H. Drying method effect on leaf chemical constituents of four crop species. **Crop Science**, Madison, v.25, p.1117-1119, 1985.

HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, Madison, v.33, p.1306-1311, 1993.

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

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, CERES, 1980. 251p.

MAZA, E.A. et al. Efeitos da defoliação total sobre o crescimento de dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes etapas da desenvolvimento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, supl. p.45, 1999.

MOORE, S. Amino acids analysis: Aqueous dimethylsulfoxide as solvent for the ninhidrin reaction. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v.243, p.6281-6283, 1968.

MOURA, G.M. Efeito do desfolhamento no rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.1, p.57-62, 1999.

NAIK, M.S. et al. Nitrate assimilation – Its regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.12, p.495-504, 1982.

NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase nitrogen in soybeans (*Glycine max*, L. Merrill). I-Effects of light and temperature. **Plant Physiology**, Bethesda, v.58, p.731-735, 1976.

PURCINO, A.A.C. et al. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.6, n.1, p.41-46, 1994.

RAJCAN, I.; TOLLENAAR, M. Source: sink ratio and leaf senescence in maize: II. Nitrogen metabolism during grain filling. **Field Crops Research**. Amsterdam, v.60, p.255-265, 1999.

REED, A.J.; BELOW, F.E.; HAGEMAN, R.H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and protease activities during grain development in maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology**, Bethesda, v.66, p.164-170, 1980.

REED, A.J. et al. Shading effects on dry matter and nitrogen partitioning, kernel number, and yield of maize. **Crop Science**, Madison, v.28, p.819-825, 1988.

SEEMANN, J.R. et al. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen use efficiency, and metabolic pools in leaves of sun and shade plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v.84, p.796-802, 1987.

SETTER, T.L.; FLANNIGAN, B.A. Sugar and starch redistribution in maize response to shade and ear temperature treatment. **Crop Science**, Madison, v.26, p.575-579, 1986.

SILVA, C.J.; MATTER, U.F.; CAZETTA, J.O. Efeito de diferentes níveis de fonte e dreno sobre a formação da espiga e produção de grãos em plantas de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8, 2001. **Anais**. CD-Rom.

SINGLETARY, G.W. et al. Response of enzymes and storage proteins of maize endosperm to nitrogen supply. **Plant Physiology**, Bethesda, v.94, p.858-864, 1990.

WATANABE, M.; HAYASHI, M. e SUGIYAMA, T. Effects of supplemental nitrate application on the activity of some nitrogen assimilation enzymes and leaf tissue productivity in maize seedlings. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokio, v.31, n.4, p.573-580, 1985.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2

PROTEÍNA SOLÚVEL, GLUTAMATO OXALOACETATO TRANSAMINASE, GLUTAMATO PIRUVATO TRANSAMINASE E PRODUÇÃO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS A DIFERENTES PROPORÇÕES FOLHAS/GRÃOS⁽¹⁾

Cesar José da Silva⁽²⁾, Uilson Fernando Matter⁽³⁾ e Jairo Osvaldo Cazetta⁽⁴⁾

Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal –SP, 14884-900, Brasil.

RESUMO: Para avaliar o efeito de diferentes proporções folhas/grãos em plantas de milho sobre a atividade das enzimas glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e glutamato piruvato transaminase (GPT), sobre o teor de proteína solúvel total e a produção de massa seca de colmos, folhas e grãos, conduziu-se um experimento a campo, onde plantas com polinização de todos os estigmas foram submetidas ao desfolhamento de 100% (0/100), 66% (33/100) e 33% (66/100) enquanto que plantas com todas as folhas tiveram 0% (100/0), 25% (100/25) e 50% (100/50) dos estigmas polinizados e um tratamento controle, plantas com 100% das folhas e polinização de 100% dos estigmas (100/100). Aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (DAP) avaliou-se o teor de proteína solúvel total, atividades da GOT e GPT, nas folhas, colmos e endospermas e a massa seca de folhas, colmos e grãos. Plantas com 0% de folhas e 25% de grãos apresentaram incrementos no teor de proteína solúvel nos endospermas,

1. Parte do projeto financiado pela FAPESP, processo nº 00/06235-0.

2. Eng. Agr., Mestrando Produção Vegetal -FCAVJ–UNESP – Bolsista FAPESP processo nº 99/12126-0 E-mail: silvacj@fcav.unesp.br

3. Eng. Agr., Mestrando Produção Vegetal - FCAVJ – UNESP – Bolsista FAPESP processo nº 99/12125-3 E-mail: ufmatter@fcav.unesp.br

4. Eng. Agr. Dr. Professor Adjunto – FCAVJ-UNESP-E-mail: cazetta@fcav.unesp.br

enquanto que plantas com 33% e 66% de desfolhamento apresentaram decréscimos aos 20 e 30 DAP quando comparados ao testemunha. Em folhas de plantas com 66% de folhas e 50% de grãos houve aumentos, enquanto que em plantas com 33% de folha 0% e 25% de grãos houve reduções no teor de proteína solúvel. Plantas com 0% e 66% de folhas e 25% e 50% de grãos tiveram a atividade da GOT nos endospermas reduzida. Nas folhas, a atividade foi baixa nos tratamentos com 25% e 50% de grãos e foi elevada nos tratamentos com 33% de folhas e 0% de grãos, quando comparados ao testemunha. Nos colmos, os tratamentos mais drásticos (0% de folha e 0% de grãos) estimularam a atividade da GOT. Plantas com 0% e 66% de folhas sofreram redução na atividade da GPT nos endospermas, enquanto que nas folhas somente o tratamento com 50% de grãos não estimulou a atividade enzimática aos 20 dap. Nos colmos de plantas sem folhas ou sem grãos a atividade aumentou progressivamente dos 2 aos 30 dap, enquanto em plantas com 33% e 66% de folhas diminuiu progressivamente após os 10 dap, mas manteve-se constante, nas quatro avaliações, em plantas com 25% e 50% de grãos. O controle do número de grãos não afetou a massa seca das folhas ao longo do período avaliado, enquanto que a massa seca dos colmos reduziu com a redução do número de folhas e aumentou com a redução do número de grãos, efeitos visualizados somente após os 20 dap. As reduções de 66% e 33% da área foliar reduziram a produção de grãos aos 30 dap em 58% e 20%, respectivamente e a redução de 75% e 50% no número de grãos, produziu 17% e 48%, respectivamente, quando comparados ao controle.

TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO: Transaminases, proteína solúvel, relação fonte/dreno, produção de milho.

SOLUBLE PROTEIN, GLUTAMATO OXALOACETATO TRANSAMINASE,
GLUTAMATO PIRUVATO TRANSAMINASE AND PRODUCTION IN PLANTS OF
CORN SUBMITTED TO DIFFERENT PROPORÇÕES LEAVES/GRAINS

ABSTRACT: To evaluate the effect of different proportions of leaves/grains in corn plants about the activity of the enzymes glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) and glutamato piruvato transaminase (GPT), the level of total soluble protein and the production of dry mass of stems, leaves and grains, he behaved an experiment to field, where you plant with pollination of all the stigmata they were submitted to the defoliation of 100% (0/100), 66% (33/100) and 33% (66/100) while you plant with all the leaves they had 0% (100/0), 25% (100/25) and 50% (100/50) of the pollinated stigmata and a treatment controls, plants with 100% of the leaves and pollination of 100% of the stigmata (100/100). To the 2, 10, 20 and 30 days after the pollination it was evaluated the tenor of total soluble protein, activities of GOT and GPT, in the leaves, stems and endosperms and the mass evaporates of leaves, stems and grains. Plants with 0% of leaves and 25% of grains presented increments in the levels of soluble protein in the endosperms, while you plants with 33% and 66% of defoliation they presented decreasing to the 20 and 30 dap when compared with the control. In the plants containing with 66% of leaves and 50% of grains suffered increases, while in plants with 33% of leaves, 0% and 25% of grains the soluble protein levels decreased. In the stems the highest values occurred in were plants without leaves and without grains. Plants from treatments with 0% and 66% of leaves and 25% and 50% of grains had the activity of GOT in the reduced endosperms. In the leaves, the activity fell in the treatments with 25% and 50% of grains and it increased in the treatments with 33% of leaves and 0% of grains, when compared to the control. In the stems the most drastic treatments (0% of leaf and 0% of grains) stimulated the GOT. Plants with 0% and 66% of leaves suffered reduction in the activity of GPT in the endosperms. In the leaves only the treatment with 50% of grains didn't stimulate the enzymatic activity at 20 dap. In the stems of plants without leaves or without grains the activity increased progressively from 2 to the 30 dap, while in plants with 33% and 66% of leaves dropped progressively after the 10 dap, staying constant, in the four evaluations, in plants with 25% and 50% of grains. The

control of the number of grains didn't affect the dry mass of the leaves along the considered period, while the mass evaporates of the stems it reduced or it increased with the reduction of the number of leaves or of the number of grains, respectively, effect only visualized after the 20 dap. The reductions of 66% and 33% of the area to foliate they reduced the production of grains to the 30 dap in 58% and 20%, respectively and the reduction of 75% and 50% in the number of grains, produced 17% and 48%, respectively, when compared to the control.

ADDITIONAL ÍNDEX TERMS: transaminases, soluble protein, source/sink relationship, corn production.

INTRODUÇÃO

Em plantas de milho o estabelecimento dos grãos, a formação inicial e o ritmo de enchimento dos mesmos são determinados pela atividade metabólica da folha (fonte de fotoassimilados) como também dos grãos (dreno de fotoassimilados), onde o nitrogênio desempenha papel fundamental na manutenção do metabolismo (SINGLENTARY et al., 1990; FALEIROS et al., 1996).

Segundo SEEMANN et al.(1987), a produtividade das culturas é grandemente determinada pela interação entre o metabolismo do carbono e nitrogênio. Esses dois processos são estreitamente interligados uma vez que a energia necessária para a assimilação do nitrogênio deriva da fotossíntese. Por sua vez, a capacidade fotossintética depende do suprimento de nitrogênio, pois grande parte do nitrogênio das folhas está alocado em proteínas enzimáticas envolvidas no processo fotossintético.

O estudo da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de plantas vem ganhando destaque em função da possibilidade de utilizar a atividade enzimática como critério indireto para a seleção de cultivares (HAGEMAN et al., 1967), para avaliar o estado nutricional das plantas em relação ao nitrogênio (VASCONCELOS et al., 1978), e ainda para determinar o potencial produtivo das plantas (CARELLI et al., 1996).

Embora seja evidente a importância do metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de milho na fase de formação e enchimento de grãos, a maioria dos estudos

ênfatisa apenas as enzimas relacionadas com a síntese de carboidratos (DOEHLERT e FELKER, 1987; CHEVALIER e LINGLE, 1983; LEE e TSAI, 1985). Entretanto, devido à íntima relação entre o metabolismo desses elementos, faz-se necessário também o estudo de enzimas envolvidas com o metabolismo do nitrogênio, pois a síntese e degradação de enzimas que catalisam as reações do metabolismo de carboidratos devem estar diretamente relacionadas com a síntese de aminoácidos precursores dos polipeptídios que, por sua vez dependem da atividade das transaminases. Segundo MALAVOLTA (1980), uma vez incorporado às plantas, o N-orgânico encontra-se em equilíbrio dinâmico, sendo continuamente desdobradas e sintetizadas substâncias nitrogenadas, através da ação das transaminases, o que permite o acúmulo e translocação do N em diferentes órgãos e em diferentes formas, dependendo da fase de desenvolvimento ou estresse a que a cultura está sendo submetida.

A maioria dos estudos com metabolismo de plantas submetidas a diferentes relações fonte dreno de fotoassimilados são desenvolvidos em condições de casa de vegetação ou em laboratórios através de técnicas de hidroponia (GENTRY e BELOW, 1993), infusão no colmo (BOYLE et al., 1994) e ainda crescimento de grãos in vitro (CAZETTA et al., 1999). Tais técnicas apresentam as vantagens de conseguir maior controle no suprimento de assimilados para o grão, apresentam maior facilidade na condução do experimento e controle dos fatores ambientais que interferem no estabelecimento e formação dos grãos (FALEIROS et al., 1996). Por outro lado, muitas vezes a obtenção de resultados em condições controladas além de serem específicos, não refletem o real comportamento das plantas no campo, impedindo assim que parâmetros do metabolismo possam ser utilizados como ferramentas por outros pesquisadores.

Na tentativa de evitar estes problemas o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes relações fonte e dreno de fotoassimilados sobre o metabolismo do nitrogênio através do desfolhamento parcial e controle do número de grãos polinizados em plantas de milho cultivadas a campo, através da avaliação da atividade das enzimas glutamato oxaloacetato transaminase e glutamato piruvato transaminase, do teor de proteína solúvel e ainda sobre a produção de massa seca dos colmos folhas e grãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Conduziu-se o experimento na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal – UNESP, num latossolo roxo com as características químicas apresentadas no quadro 1.

Quadro 1. Análise Química do solo

pH em CaCl ₂	M.O. g/dm ³	P (resina) mg/dm ³	K -----	Ca	Mg mmol _c /dm ³	H+Al -----	SB	T	V %
5,3	29	53	4,2	45	18	38	67,2	105,2	64

Nesta área, preparada no sistema de plantio convencional, cultivou-se o milho híbrido simples, super precoce e com baixa prolificidade “Agromen 3050”, plantado no espaçamento de 0,9m entre linhas e 20 cm entre plantas, adubado conforme recomendação para a cultura no estado de São Paulo (FORNASIERI FILHO, 1992). O experimento constou de sete tratamentos: 1) Plantas com 100% das folhas e polinização de todos os grãos (controle) (100/100), 2) retirada de todas as folhas; com polinização de 100% dos grãos (0/100), 3) retirada de dois terços das folhas; com polinização de 100% dos grãos (33/100), 4) retirada de um terços das folhas; com polinização de 100% dos grãos (66/100), 5) sem retirada de folhas; com polinização de 0% dos grãos (100/0), 6) sem retirada de folhas; com polinização de 27% dos grãos (100/27) e 7) sem retirada de folhas; com polinização de 50% dos grãos (100/50), aplicados na fase de pendoamento da cultura. Inicialmente, pretendia-se ter 33 e 66% de dreno, porém, em função da impossibilidade de controlar perfeitamente a polinização, obteve-se somente 25 e 50%, respectivamente. O experimento foi disposto em blocos casualizados com quatro repetições totalizando 28 parcelas de 63 m² de área útil com 1 metro de bordadura.

Para controlar a proporção de folhas manteve-se um número de folhas correspondente à percentagem de cada tratamento, sendo essas distribuídas uniformemente na planta, a folha mais próxima da espiga sempre foi mantida, pois foi a folha coletada para ser submetida às análises laboratoriais. A proporção de grãos foi estabelecida através da polinização controlada dos estigmas da espiga. Em plantas

com 100 % de grãos, após a polinização artificial as espigas foram mantidas expostas para garantir que o máximo dos estigmas fosse polinizado.

Aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização coletaram-se 10 plantas por parcela, foram separados os colmos, folhas e espigas, que foram secos em estufa a 65 – 70°C até massa constante para a determinação da massa seca. Das dez plantas coletadas em cada parcela retiraram-se amostras de folhas e colmos na altura da inserção da espiga, bem como grãos do terço médio da espiga, imediatamente após o corte das plantas. Este material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo posteriormente liofilizado até massa constante, separado o endosperma dos grãos, moído finamente na presença de nitrogênio líquido e armazenado em freezer a –65 °C, material este utilizado para a determinação da proteína solúvel total e atividade das enzimas GOT e GPT.

Realizou-se a extração das proteínas e enzimas de acordo com SINGLETARY et al. (1990) e CAZETTA (1997). Por volta de 50 mg de amostra liofilizada foi homogeneizada, por 30 segundos, a 4 °C, em 1 mL de tampão extrator HEPES (ácido N-2-hidroximetilpiperazina- N'-2-etanossulfônico) 50 mM, pH 7,7, contendo MgCl₂ 5 mM e DTT (Ditiotreitol) 1 mM, submetido a uma centrifuga refrigerada (20.000 g, 4 °C, 20 minutos) e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade enzimática e o teor de proteína solúvel total.

A atividade da GOT foi determinada de acordo com DOEHLERT (1987) e SINGLETARY et al. (1990). Em meio constituído de: Tampão Bicina [N,N-di-(hidroxietil)glicina] 50 mM, pH 8,5; MgCl₂ 5 mM, L-aspartato 30 mM; NADH 0,2 mM; Desidrogenase málica 2,5 UI / mL e 25 µL de extrato enzimático para um volume final de 1 mL e ∞-cetogluturato 10 mM. Mediu-se a atividade pela velocidade de formação de NAD⁺, a 30 °C, a 340 nm por 10 minutos.

A atividade da GPT foi determinada utilizado-se princípio semelhante ao aplicado para a GOT (DOEHLERT, 1987, SINGLETARY et al., 1990). Sendo o meio assim constituído: Tampão HEPES 50 mM, pH 7,2; MgCl₂ 5 mM, L-alanina 20 mM; NADH 0,2 mM; Desidrogenase láctica; 2,5 UI / mL; e 25 µL de extrato enzimático.

Usando o extrato preparado para determinação da atividade enzimática, determinou-se o teor de proteínas solúveis através do método descrito por PETERSON (1977), que envolve a precipitação com TCA (ácido tricloroacético) 72%; centrifugação (1800 g, 15 minutos); ressuspensão com SDS (dodecil sulfato de sódio); reação colorimétrica com reagente de Folin-Ciocalteu e solução de CTC (cobre-tartarato-carbonato), com posterior determinação espectrofotométrica a 750 nm. Para conversão das absorbâncias em concentração utilizou-se uma curva padrão usando albumina de soro bovino como padrão.

Os resultados das avaliações foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, segundo indicações de BANZATO e KRONKA (1992). Para as análises estatísticas utilizou-se o programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas (V. 2.0), desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas e Pólo Computacional da FCAV-Unesp - Jaboticabal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de proteína solúvel nas folhas, colmos e endospermas variaram em função das proporções de folhas/grãos, sendo que o efeito variou dependendo da parte da planta analisada e da época de amostragem (Figuras 1, 2 e 3).

As plantas submetidas ao desfolhamento total (0/100) apresentaram maior teor de proteína solúvel nos endospermas em todas as avaliações, quando comparado aos demais tratamentos, seguido do tratamento com 25% de grãos (100/25). O teor de proteína solúvel nos endospermas das plantas submetidas a 33% e 66% de desfolhamento foi menor que nas plantas testemunhas aos 20 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos (Figura 1). Ao longo do tempo ocorreram reduções significativas nos teores de proteína solúvel dos endospermas em todos os tratamentos, sendo os menores valores observados aos 30 dap.

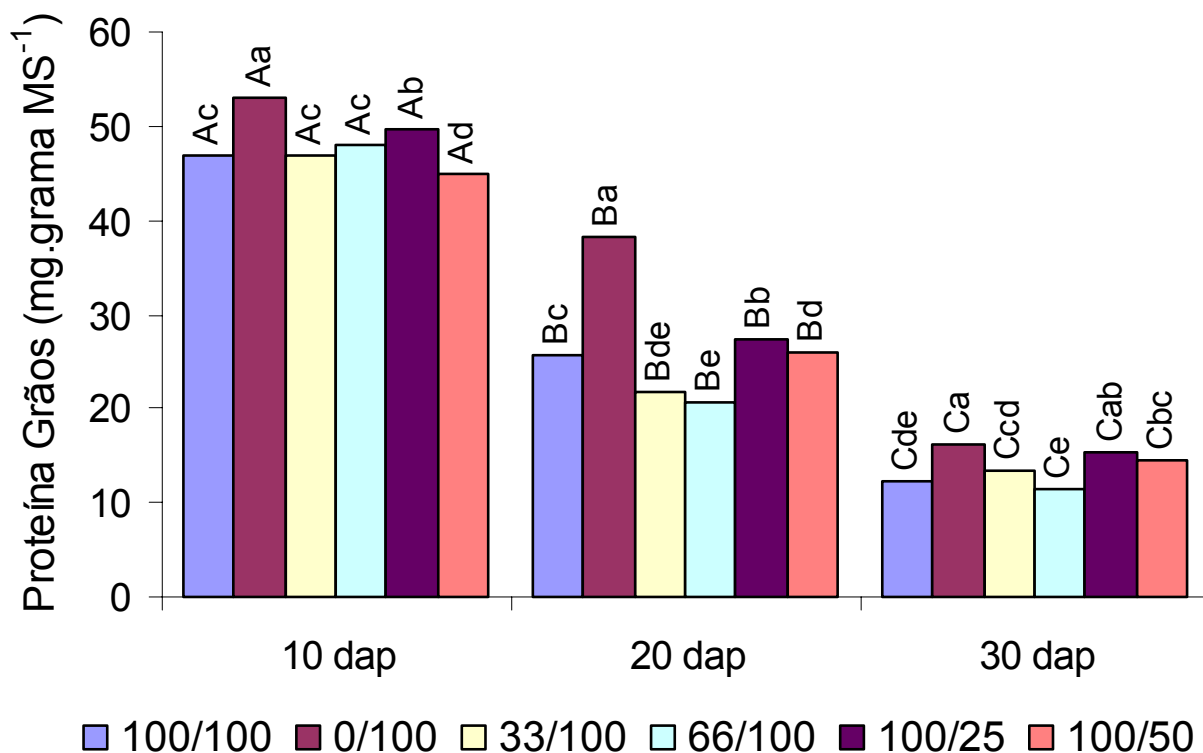


Figura 1. Teor de proteína solúvel no endosperma de grãos de milho aos 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 2,16 e 2,25% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os níveis de proteína solúvel nas folhas (Figura 2) apresentaram valores máximos aos dois dias após a polinização para todos os tratamentos, reduzindo gradativamente até os 20 dap, mantendo-se constante dos 20 aos 30 dap. O comportamento dos tratamentos não foi o mesmo em todas as avaliações, porém as plantas com 60% das folhas (66/100) e 50% dos grãos (100/50), apresentaram aumentos significativos no teor de proteína solúvel. Nos tratamentos com 33% das

folhas (33/100), 0 e 25% de grãos (100/0 e 100/25, respectivamente) o teor de proteína solúvel nas folhas reduziu significativamente, quando comparados ao controle.

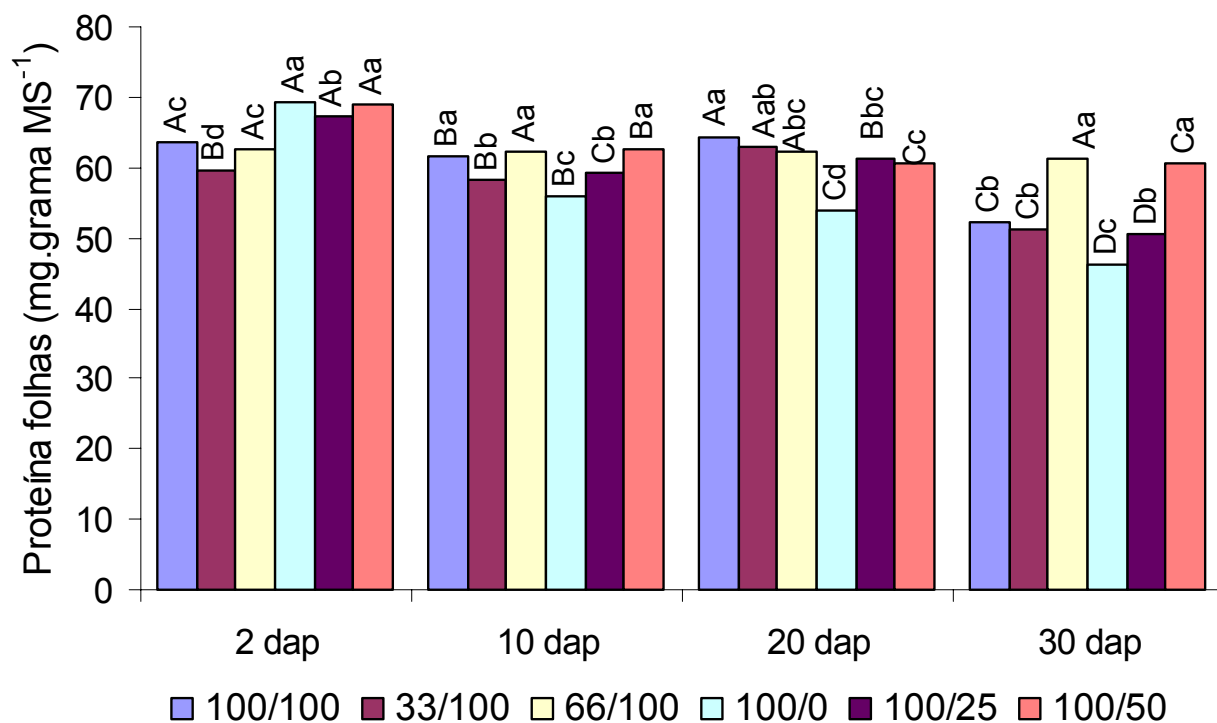


Figura 2. Teor de proteína solúvel em folhas de plantas de milho aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 1,39 e 1,52% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Plantas sem grãos (100/0) e sem folhas (0/100), foram as grandes acumuladoras de proteína solúvel nos colmo (Figura 3), provavelmente por demandarem menos metabólitos em função da falta de folha, ou por não possuírem dreno suficiente nas espigas. Por outro lado, observou-se que em plantas normais (100/100) ou plantas que

sofreram desfolhamentos menos drásticos (33/100 e 66/100) e com parte dos grãos na espiga (100/25 e 100/50), praticamente não diferem entre si nas avaliações, enquanto que entre as avaliações o teor de proteína solúvel no colmo diminuiu drasticamente após os 10 dias após a polinização.

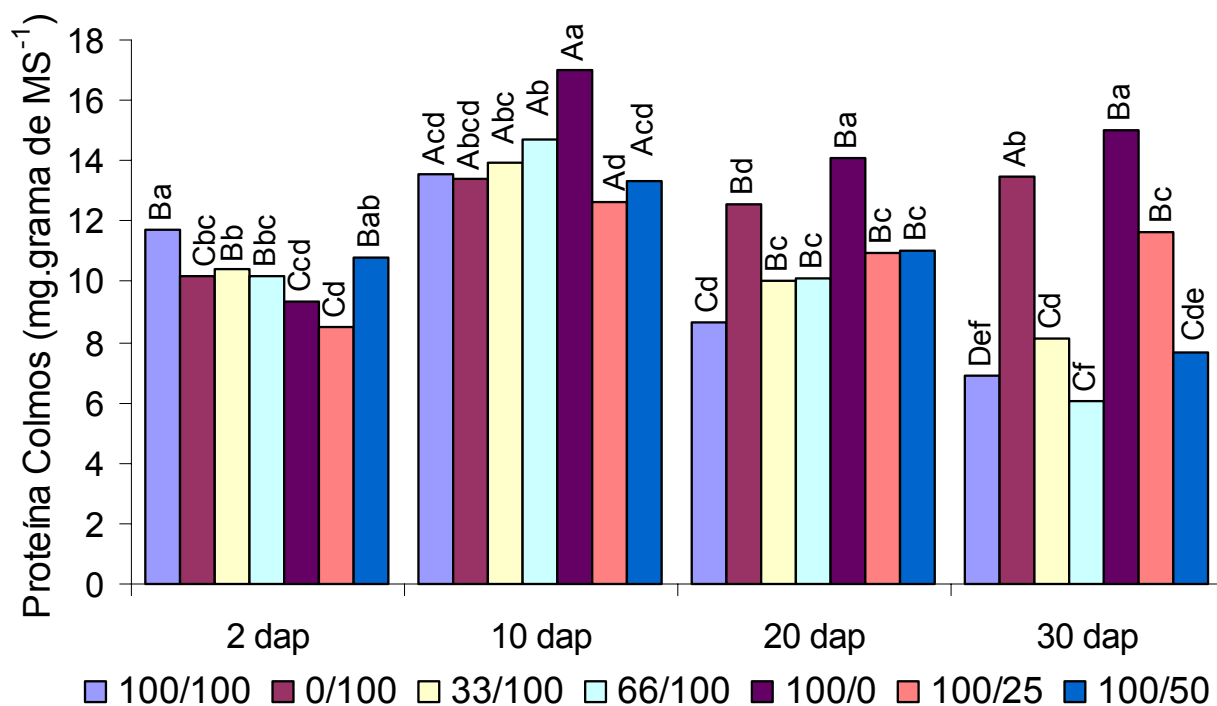


Figura 3. Teor de proteína solúvel no colmo de plantas de milho aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 4,75 e 4,18% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O comportamento da atividade da glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT), nos endospermas, acompanhou a tendência observada para o teor de proteína solúvel (Figura 4). A atividade desta enzima nos endospermas foi significativamente maior aos

10 dias após a polinização, independentemente do tratamento aplicado, reduzindo gradativamente até os 30 dap.

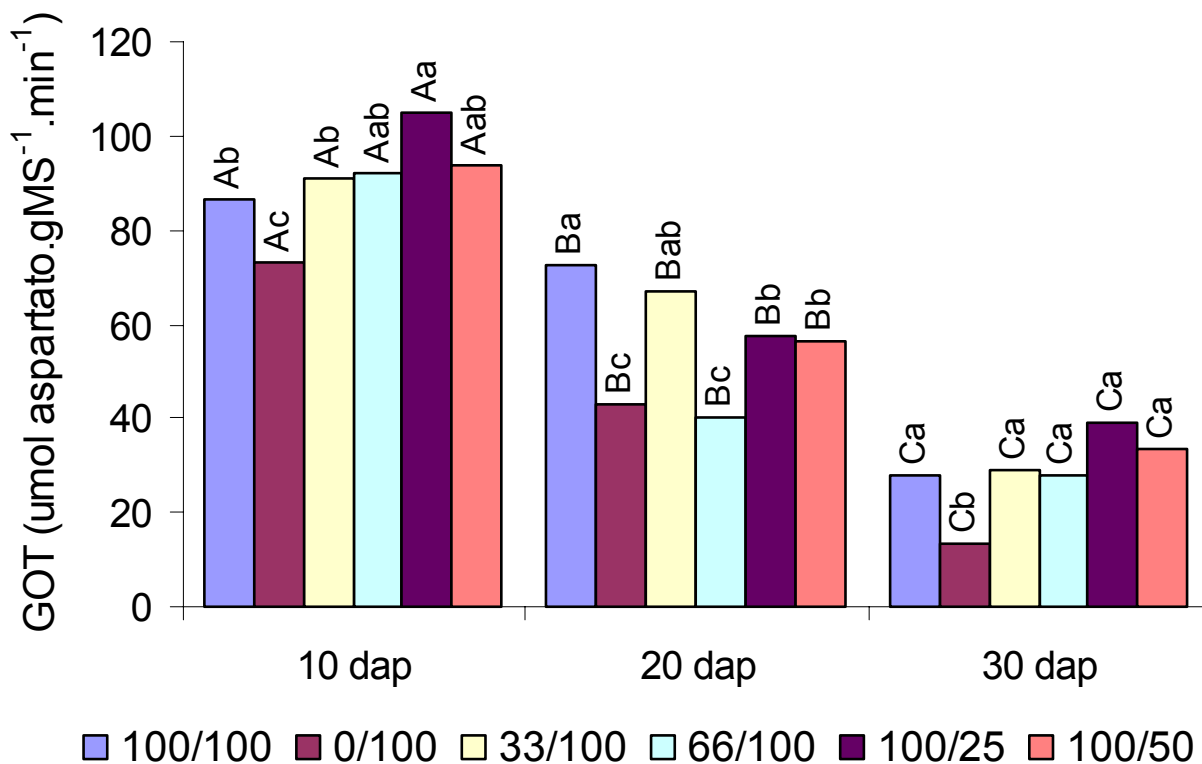


Figura 4. Atividade da Enzima Glutamato Oxoaloacetato Transaminase no endosperma de grãos de milho aos 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 8,57 e 11,66% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Outro fato observado é que aos 30 dap não houve diferença na atividade enzimática entre os tratamentos, provavelmente porque nesta fase os grãos já estavam praticamente formados, e a transaminação não se fazia mais necessária nestes órgãos.

Houve redução significativa da atividade da GOT aos 20 dap nos tratamentos com 0 e 66% de folhas e 25 e 50% de grãos (Figura 4), mas não se verificou efeito negativo na atividade da enzima no tratamento com 33% de folhas quando comparados ao tratamento testemunha (100/100)

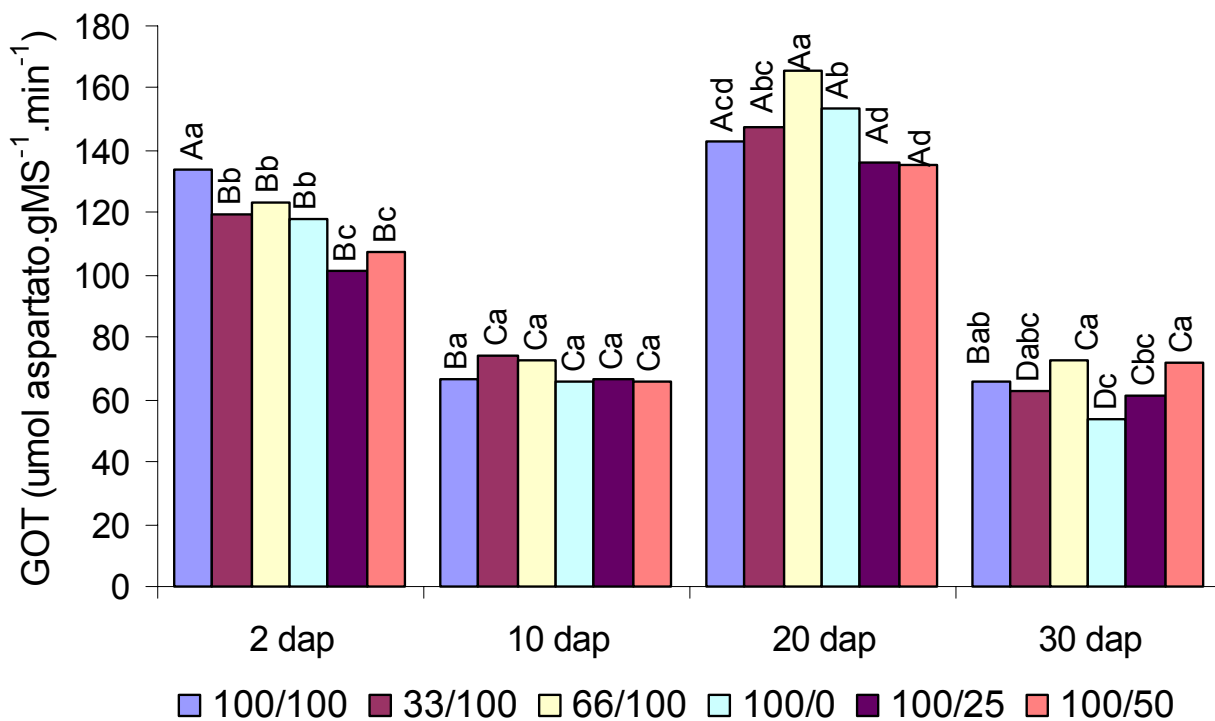


Figura 5. Atividade da Enzima Glutamato Oxoaloacetato Transaminase em folhas de plantas de milho aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 3,85 e 5,14% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A atividade da GOT nas folhas variou ao longo do período avaliado, sendo que os tratamentos apresentaram os maiores valores aos 20 dap e os menores aos 10 e 30

dap, (Figura 5). Aos 2 e 20 dap as plantas com 66% de folhas (66/100), apresentaram maior atividade enzimática, seguidas das com 33% de folhas e sem a presença de grãos na espiga (100/0).

A atividade da GOT nas folhas de plantas com 25% e 50% de grãos na espiga, reduziu significativamente aos 2, 20 e 30 dap, quando comparados ao tratamento testemunha.

Nos colmos, a máxima atividade da GOT foi observada aos 10 dap para o tratamento testemunha, para os com 0% e 66% de folhas e ainda nos com 50% dos grãos, enquanto que as plantas com 33% de folhas e 25% de grãos a maior atividade foi aos 20 dap (Figura 6).

O comportamento da atividade da GOT seguiu a mesma tendência nos colmos, nas folhas e nos grãos, acompanhando o teor de proteína solúvel, ou seja, os tratamentos mais drásticos tanto de controle de folhas quanto de grãos estimularam significativamente a atividade enzimática.

A glutamato-piruvato transaminase (GPT), apresentou comportamento semelhante ao da GOT quando comparadas entre as avaliações (Figuras 7, 8 e 9), embora tenha tido atividades relativamente menores nos endospermas, folhas e colmos.

A diferença entre as atividades das transaminases é destacada nas folhas onde a GPT apresentou atividades em torno de 5% das obtidas para a GOT, independente do tratamento aplicado. Estes dados concordam com os de CAZETTA (1997), que encontrou atividades da GPT em torno de 20% das obtidas para a GOT, em folhas de plantas de milho submetidas a diferentes doses de NPK. SINGLENTARY et al. (1990), avaliando o suprimento de nitrogênio em grãos de milho cultivados in vitro, também encontraram atividades menores da GPT quando comparadas às da GOT.

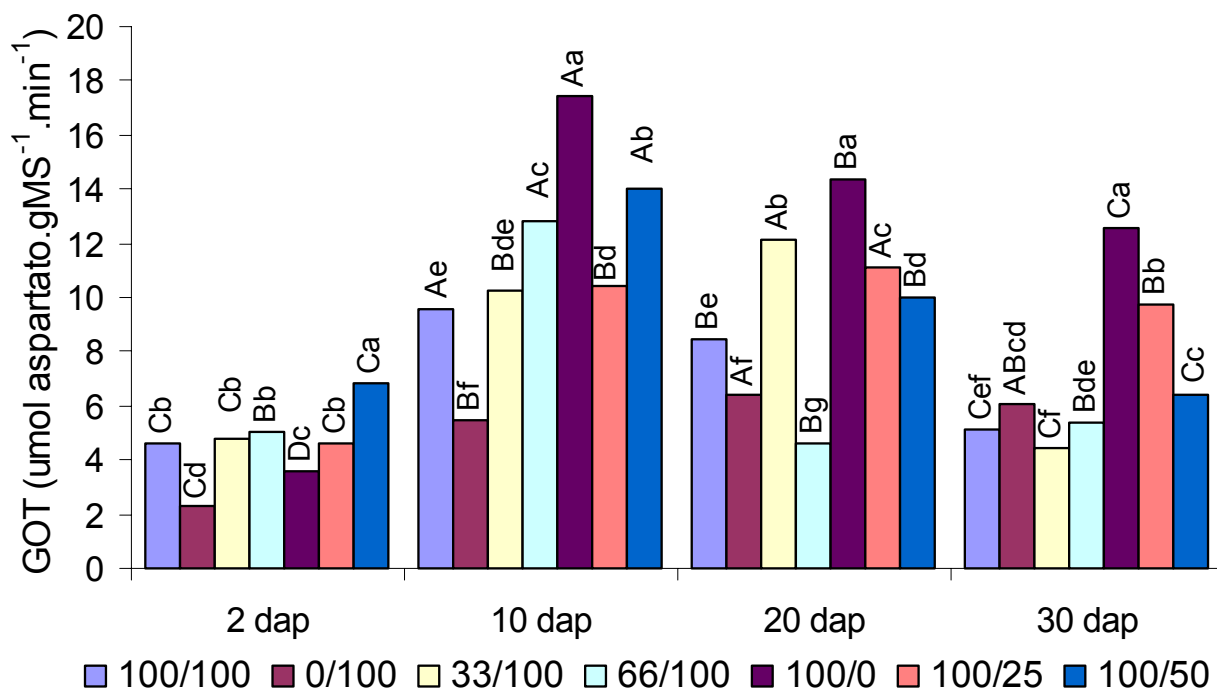


Figura 6. Atividade da Enzima Glutamato Oxoaloacetato Transaminase no colmo de plantas de milho aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 4,71 e 5,03% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A atividade da GPT nos endospermas foi máxima aos 10 dap (Figura 7), independente do tratamento, com diminuição gradativa até os 30 dap. Avaliando os tratamentos independentemente, observa-se que a redução mais drástica na atividade da GPT ocorreu nos endospermas de plantas com 0% e 66% de folhas, enquanto que os tratamentos com 33% de folhas, 25% e 50% de grãos, mantiveram as maiores atividades em todas as avaliações, sendo superiores a atividade da GPT nos

endospermas das plantas do tratamento testemunha somente aos 30 dap. Este comportamento segue a mesma tendência da atividade da GOT e provavelmente ocorreu, pois, as plantas que tem área foliar ou número de grãos afetados tendem a aumentar a atividade enzimática e provavelmente todo seu metabolismo para se recuperar do estresse sofrido.

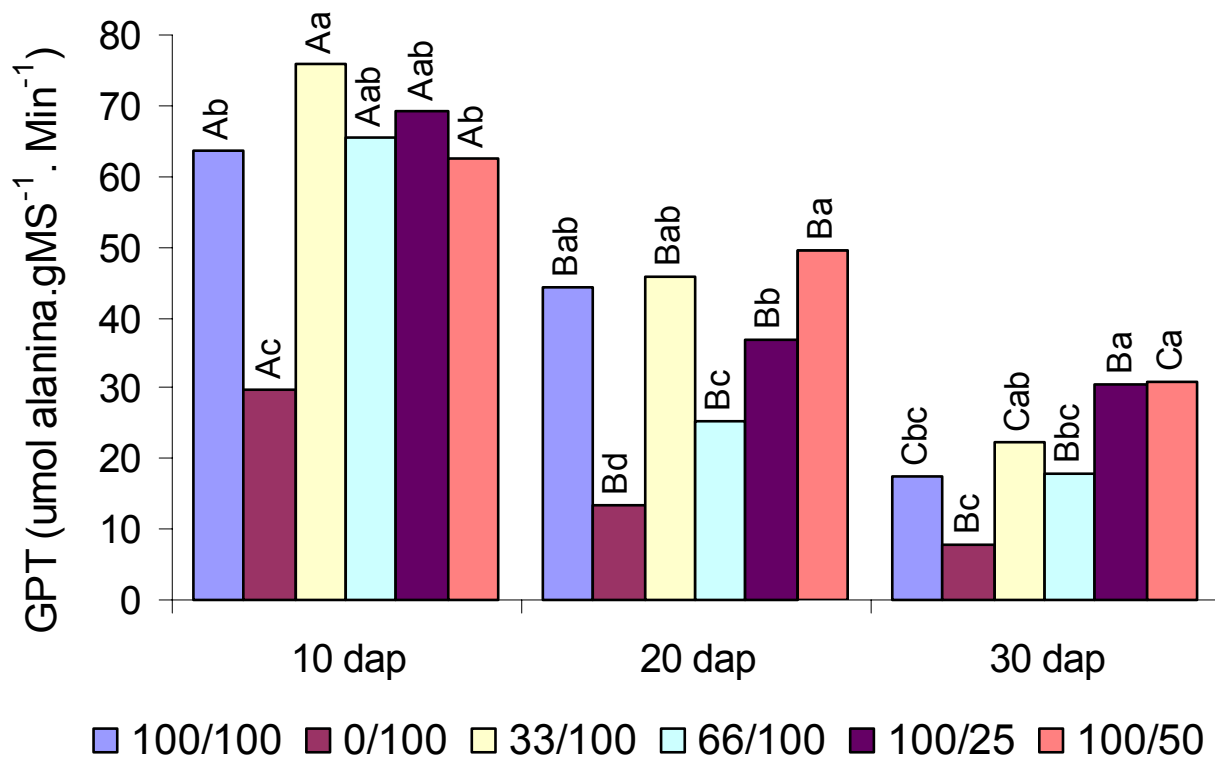


Figura 7. Atividade da Enzima Glutamato Piruvato Transaminase em endospermas de grãos de milho aos 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 10,10 e 15,02% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Plantas que sofreram a retirada de 100% das folhas devem ter degradado parte das as macromoléculas, inclusive as enzimas analisadas, para fornecerem energia as células na tentativa de sobrevivência, mas morreram precocemente.

A análise da Figura 8 demonstra que a GPT na folha atua efetivamente num período restrito da fase reprodutiva da cultura, pois a atividade desta enzima sofreu um grande incremento aos 20 dap, enquanto que aos 2, 10 e 30 dap a atividade foi extremamente baixa, não diferindo entre os tratamentos.

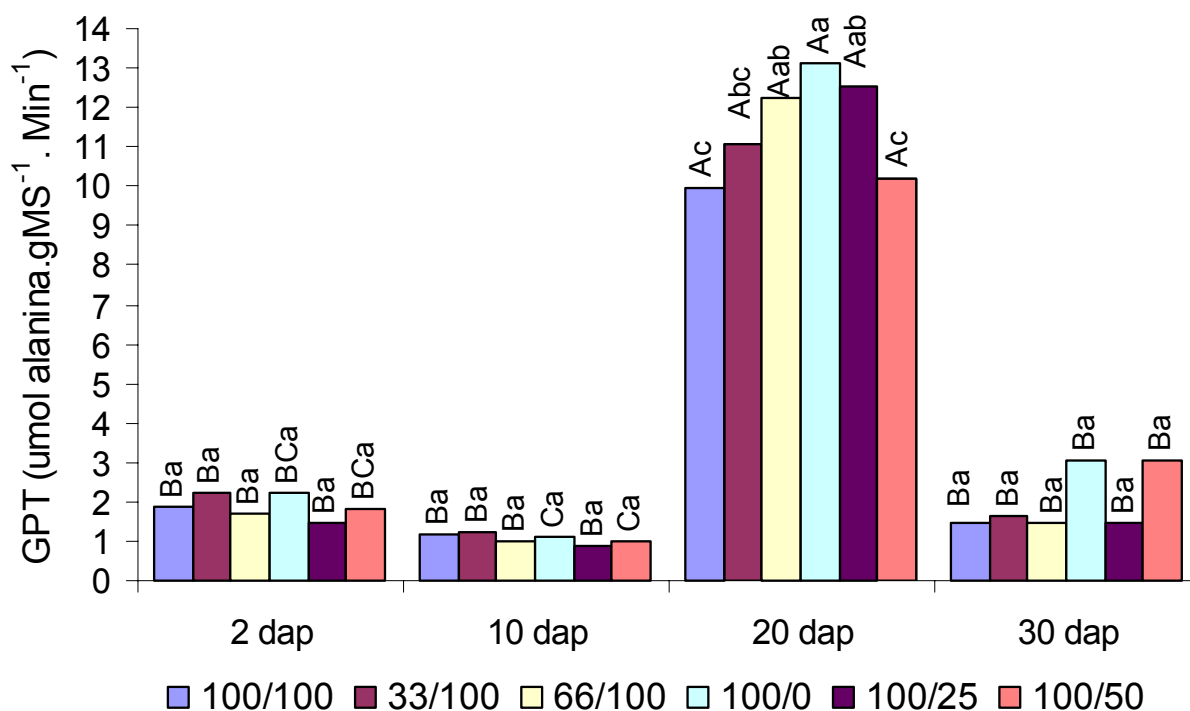


Figura 8. Atividade da Enzima Glutamato Piruvato Transaminase em folhas de plantas de milho aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 20,14 e 18,79% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 20 dap observa-se que todos os tratamentos estimularam a atividade da GPT na folha, menos o tratamento com 50% de grãos que manteve a atividade enzimática na folha semelhante ao do tratamento testemunha (Figura 8).

A atividade da GPT nos colmos revelou-se aproximadamente 50% da atividade observada para a GOT (Figura 9), sendo que os tratamentos tiveram comportamentos distintos quando comparados em cada avaliação.

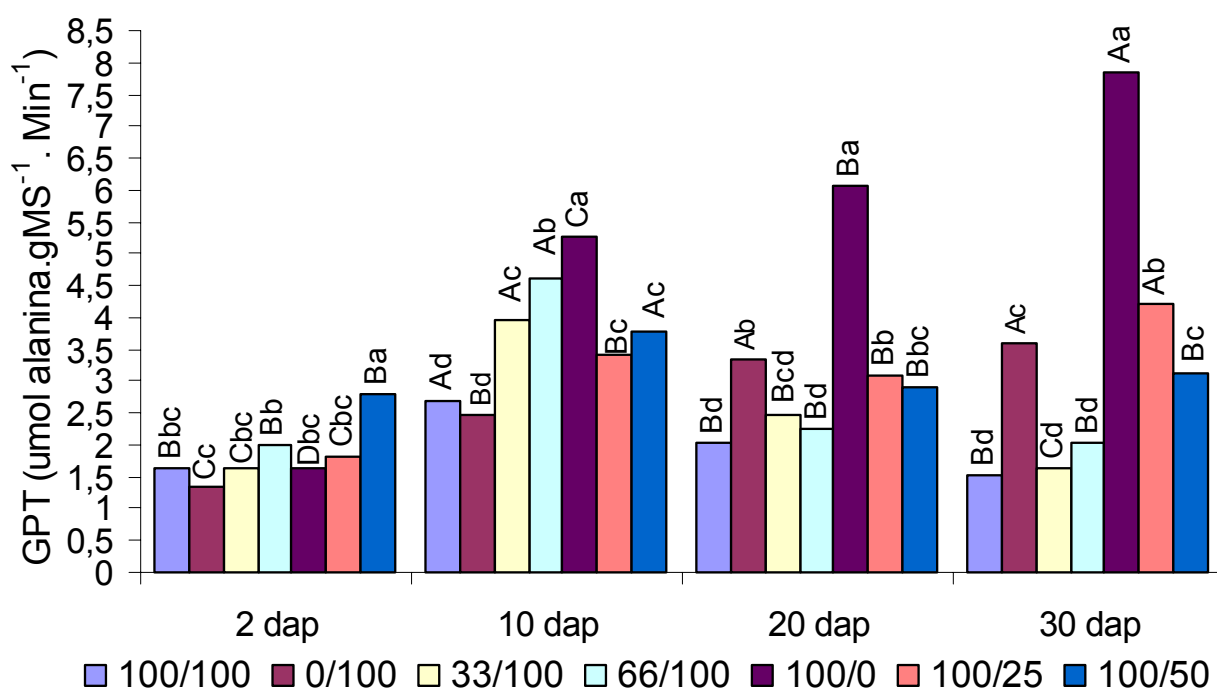


Figura 9. Atividade da Enzima Glutamato Piruvato Transaminase no colmo de plantas de milho aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, analisadas em triplicata no laboratório, apresentando C.V. de 9,56 e 8,53% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Plantas do tratamento testemunha e dos com 33% e 66% de folhas apresentaram elevação na atividade da GPT nos colmos dos 2 aos 10 dap, em seguida sofrendo queda progressiva até os 30 dap. A atividade no colmo de plantas com 25% e 50% de grãos na espiga apresentou elevação dos 2 aos 10 dap e depois manteve-se constante até os 30 dap. Os tratamentos mais drásticos, ou seja, plantas sem folhas (0/100) ou sem grãos (100/0), promoveram aumentos progressivos na atividade da GPT nos colmos dos 2 aos 30 dap.

Não houve diferenças significativas entre as avaliações quanto ao acúmulo de massa seca no colmo das plantas que sofreram desfolha total (Figura 10). Nos demais tratamentos de redução da fonte observou-se decréscimo no acúmulo de massa seca entre os 10 e 20 dap, e aumento a partir de então, o que também foi observado nos tratamentos com 25% e 50% de grãos. O maior acúmulo de massa seca no colmo foi obtido no tratamento com 0% de grãos. Quanto maior o tamanho da fonte e menor o tamanho do dreno, maior foi o acúmulo de massa seca no colmo.

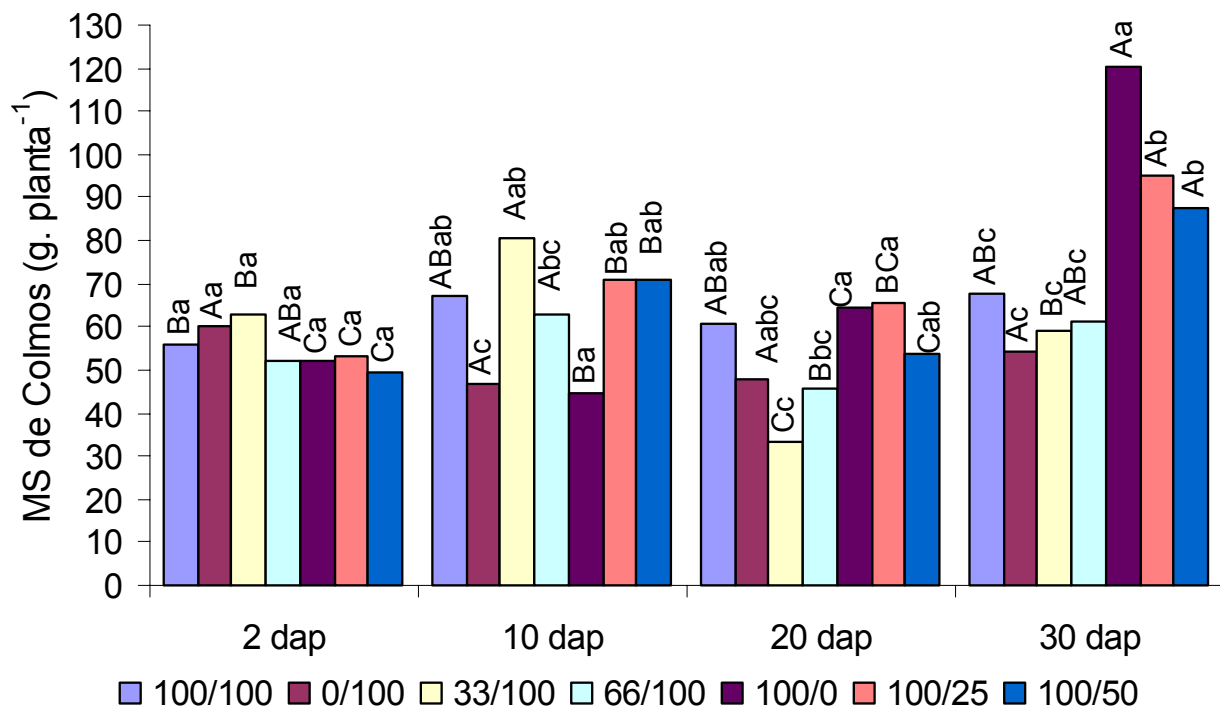


Figura 10. Massa seca de colmos, total por planta aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, onde coletou-se 10 plantas, apresentando C.V. de 14,21 e 12,61% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A produção de massa seca total de folhas por planta (Figura 11), foi maior no tratamento com 0% de grãos, quando comparado aos demais tratamentos com 100% de fonte, isso provavelmente ocorreu devido o aumento da área foliar total da planta, já que o aumento de MS por unidade de área não diferiu (SILVA, MATTER e CAZETTA, 2001). Quando se comparou cada tratamento nas diferentes épocas, observou-se que a massa seca de colmos aumentou significativamente dos 0 d.a.p. para os 30 d.a.p., somente nos tratamentos com 66% de folhas e 0% de grãos, indicando que as plantas

com limitação de dreno continuaram vegetando mesmo após entrar na fase reprodutiva, enquanto as dos demais tratamentos direcionaram seus metabólitos para a formação da espiga, praticamente cessando o acúmulo de MS nas folhas.

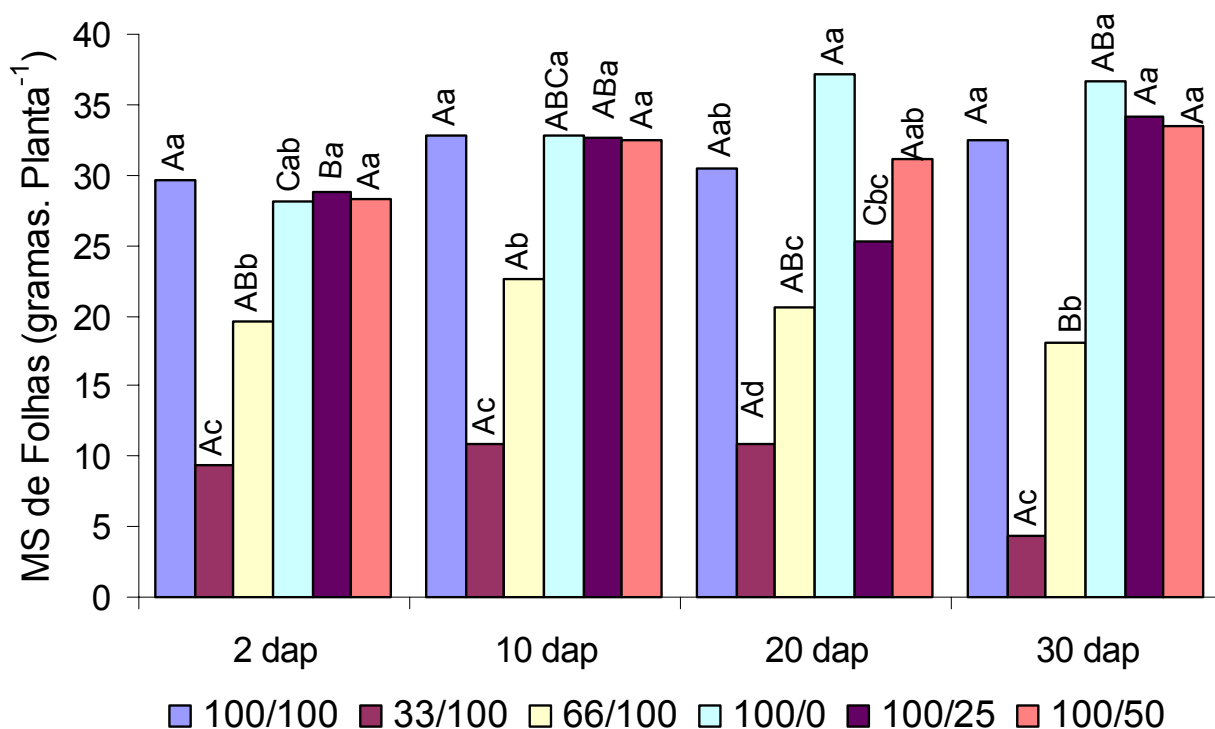


Figura 11. Massa seca de folhas, total por planta aos 2, 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, onde coletou-se 10 plantas, apresentando C.V. de 16,49 e 11,09% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A produção de grãos (Figura 12) foi diretamente afetada pela limitação da fonte, o que é comprovado quando compara-se os tratamentos testemunha, com 33% e 66% fonte. Observou-se que a retirada de apenas 33% das folhas da planta (66/100),

promoveu uma redução de 20% na produção, enquanto a retirada de 66% das folhas (33/100) reduziu 58% a produção de grãos quando comparado ao tratamento testemunha.

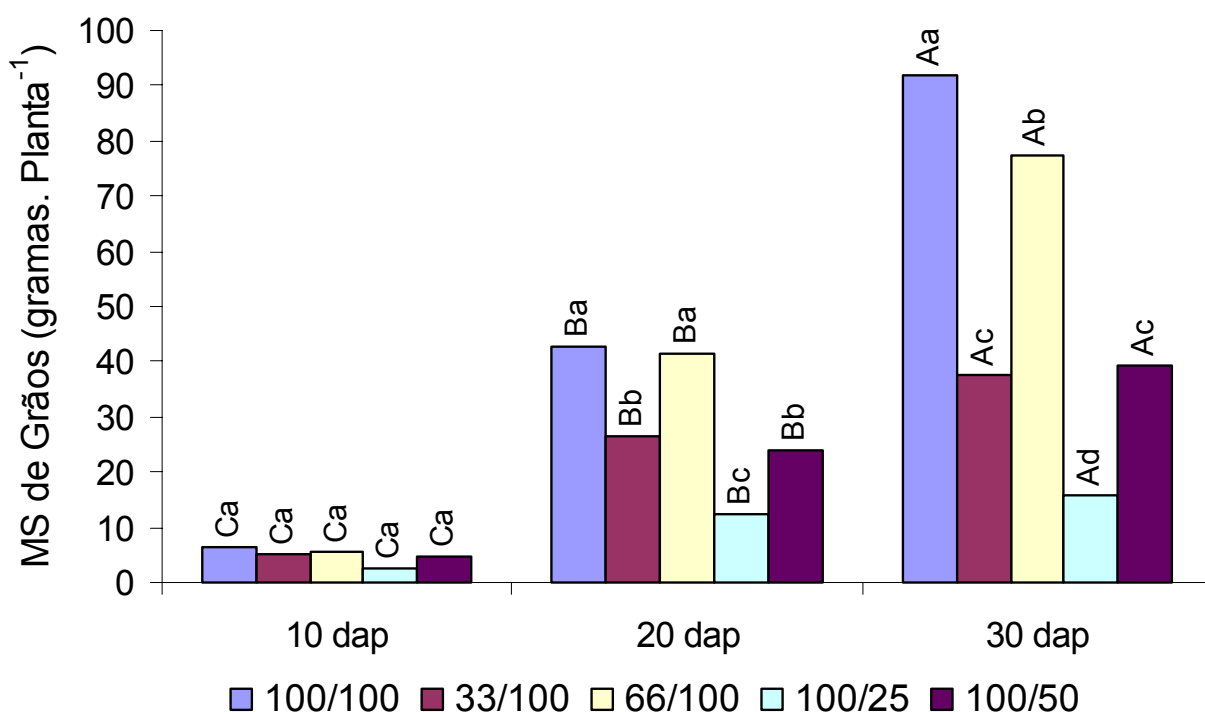


Figura 12. Produção de grãos por planta aos 10, 20 e 30 dias após a polinização (dap) em função de diferentes proporções folha/grãos aplicadas na fase de polinização da cultura. Cada barra da figura representa a média de quatro parcelas, onde coletou-se 10 plantas, apresentando C.V. de 14,29 e 11,96% para tratamentos e avaliações respectivamente. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para avaliações e minúsculas para tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram esclarecer que:

- Os teores de proteína solúvel foram mais afetados nos grãos, onde os maiores valores foram encontrados aos 10 dap., nos tratamentos sem folhas e sem grãos.
- A GOT e GPT tiveram atividades máximas aos 10, 20 e 10 dap em grãos, folhas e colmos, respectivamente, sendo que o desfolhamento total e a ausência de grãos na espiga estimularam a atividade das transaminases nas diferentes partes da planta.
- A atividade da GPT foi 95%, 31% e 61% inferior à da GOT nas folhas, endospermas e colmos, respectivamente.
- O controle do número de grãos não afetou a massa seca das folhas ao longo do período avaliado ao passo que a massa seca dos colmos diminuiu com a redução do número de folhas por planta e aumentou com a redução do número de grãos, efeito visualizado aos 20 dap.
- As reduções de 66% e 33% no número de folhas reduziram a produção de grãos aos 30 dap em 58% e 20%, respectivamente e a redução de 75% e 50% no número de grãos, promoveu a produção de 17% e 48%, respectivamente, quando comparados ao controle.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro e bolsas concedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANZATO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247p.

BOYLE, M.G.; BOYER, J.S.; MORGAN, P.W. Stem infusion of maize. **Crop Science**, Madison, v.31, p.1241-1245, 1995.

CARELLI, M.L.C. et al. Níveis de nitrogênio, metabolismo, crescimento e produção de girassol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.8, n.2, p.123-130, 1996.

CAZETTA, J.O. **Influência do nitrogênio, fósforo e potássio no metabolismo, no desenvolvimento e na produção de plantas de milho**. 1997. 121f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAZETTA, J.O.; SEEBAUER, J.R.C.; BELOW, F.E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels growing in vitro. **Annals of Botany**, London, v.84, p.747-754, 1999.

CHEVALIER, P.; LINGLE, S.E. Sugar metabolism in developing kernels of wheat and barley. **Crop Science**, Madison, v.23, p.272-277, 1983.

DOEHLERT, D.C. Ketone reductase activity in developing maize endosperm. **Plant Physiology**, Bethesda, v.84, p.830-834, 1987.

DOEHLERT, D.C.; FELKER, F.C. Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.70, p.51-57, 1987.

FALEIROS, R.R.S.; SEEBAUER, R.J.; BELOW, F.E. Nutritionally induced changes in endosperm of shrunken-1 and brittle-2 maize kernels grown in vitro. **Crop Science**, Madison, v.36, p.947-954, 1996.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

GENTRY, L.E.; BELOW, F.E. Maize productivity as influenced by form and availability of nitrogen. **Crop science**, Madison, v.33, p.491-497, 1993.

LEE, L.; TSAI, C.Y. Effect of sucrose accumulation on zein synthesis in maize starch-deficient mutants. **Phytochemistry**, Oxford, v.24, p.225-229, 1985.

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

PETTERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, New York, v.83, p.346-56, 1977.

SEEMANN, J.R. et al. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen use efficiency, and metabolic pools in leaves of sun and shade plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v.84, p.796-802, 1987.

SILVA, C.J.; MATTER, U.F.; CAZETTA, J.O. Efeito de diferentes níveis de fonte e dreno sobre a formação da espiga e produção de grãos em plantas de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8.,2001, Ilhéus. **Anais**. CD-Rom.

SINGLETERY, G.W. et al. Response of enzymes and storage proteins of maize endosperm to nitrogen supply. **Plant Physiology**, Bethesda, v.94, p.858-864, 1990.

VASCONCELOS, C.A. et al. Atividade da reductase do nitrato em milho (*Zea mays* L. var. 'Piranão') em níveis crescentes de nitrogênio. **Revista Ceres**, Viçosa, v.25, n.139, p.218-227, 1978.

CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES

O estudo do metabolismo do nitrogênio em plantas de milho demonstrou-se extremamente complexo, pois envolve a síntese, degradação, deposição e transporte de vários metabólitos, bem como a síntese e a ativação de enzimas que desempenham papel fundamental no crescimento e atuação nos diferentes órgãos e, conseqüentemente na produção das plantas, sofrendo influência de vários fatores dentre eles os relacionados à fonte e dreno de fotoassimilados. Além disso, certamente está intimamente relacionado com o metabolismo do carbono na planta exigindo que se tenha conhecimento nas áreas de fisiologia e bioquímica de plantas, para que se possa compreender a planta como um todo, entendendo os mecanismos de resposta aos diferentes tratamentos.

Das enzimas avaliadas, no presente trabalho a atividade das transaminases foi a que mais variou enquanto que a atividade da redutase do nitrato na folha não foi afetada. A maior atividade das transaminases nos tratamentos sem folhas e sem grãos coincide com os maiores teores de N-total nos colmos, de aminoácidos livres, proteína solúvel e N-nitrato nas folhas e colmos, além do aparecimento de sintomas de senescência precoce nas folhas e maior acúmulo de massa seca nos colmos de plantas sem grãos e ainda maior tamanho dos grãos remanescentes nas plantas em que se controlou a polinização.

Estes resultados levam a concluir que a limitação da fonte ou do dreno não promove acúmulo de diferentes formas de N na planta em função da limitação da síntese protéica, mas sim pela tentativa de compensar o metabolismo em função da redução do número de folhas (fonte de fotoassimilados) tiveram que remobilizar compostos das folhas remanescentes e principalmente do colmo na tentativa de manter o enchimento dos grãos. Entretanto, no caso mais extremo em que foram retiradas todas as folhas das plantas as reservas do colmo não conseguiram sustentar a demanda da espiga e toda a planta entrou em colapso. No caso da redução do número de grãos na espiga, boa parte dos metabólitos nitrogenados, e provavelmente também

os glicídicos, que normalmente seriam translocados para a espiga foram desviados para o colmo promovendo o incremento de massa seca dos mesmos, ou acumularam nas folhas, acompanhado do surgimento de sintomas de senescência precoce nas mesmas.

O presente trabalho, além de trazer contribuições para se compreender o comportamento do metabolismo do nitrogênio em plantas de milho que tenham suas relações fonte/dreno alteradas, ofereceu a oportunidade de trabalhar com alguns aspectos metodológicos da instalação e condução de experimentos que merecem ser mencionados. Por exemplo, o estabelecimento de diferentes níveis de fonte e dreno através da manutenção de diferentes números de folhas na planta e da polinização parcial dos estigmas na espiga não exigindo grande estrutura para promover condições de cultivo controlado e oferecendo bons resultados. Entretanto, há a necessidade de aprimoramento do controle do dreno, através do reforço da polinização ao longo da fase reprodutiva para garantir que os estigmas mais tardios sejam fecundados, evitando-se o problema do não estabelecimento exato do nível de dreno pretendido.

Deve ser considerada ainda, em estudos desta natureza a necessidade da avaliação conjunta do metabolismo nitrogenado e glicídico para facilitar o entendimento do comportamento da planta; o estudo do comportamento metabólico de genótipos com diferentes capacidades de remobilização de fotoassimilados; o estudo de proteases ligadas à degradação de compostos mais complexos do metabolismo do nitrogênio e glicídico das plantas submetidas à restrição de fonte ou dreno de fotoassimilados; o estudo de padrões isoenzimáticos das enzimas estudadas em função dos tratamentos aplicados o que provavelmente permitiria dar respostas mais exatas do comportamento do metabolismo das plantas, pois há evidências da existência de diferentes isoenzimas que apresentam respostas diferenciadas em função do maior ou menor suprimento de seus substratos cujas variações não são detectadas analisando a atividade total.