

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

SOMBREAMENTO E APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO EM
PLANTAS JOVENS DE *Jatropha curcas* L.

SIMONE SILVA HIRAKI

Bióloga

Ilha Solteira
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto, 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

SOMBREAMENTO E APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO EM
PLANTAS JOVENS DE *Jatropha curcas* L.

SIMONE SILVA HIRAKI

Orientada

Prof. Dr. ENES FURLANI JUNIOR

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção.

Ilha Solteira

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

H668s	<p>Hiraki, Simone Silva. Sombreamento e aplicação de nitrogênio em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L. / Simone Silva Hiraki. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2011 113 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2011</p> <p>Orientador: Enes Furlani Junior Inclui bibliografia</p> <p>1. Pinhão-manso. 2. Concentração de nitrato. 3. Luminosidade. 4. Alocação de fotoassimilados. 5. Metabolismo do nitrogênio.</p>
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

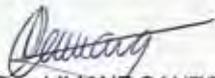
TÍTULO: SOMBREAMENTO E APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE
Jatropha curcas L.

AUTORA: SIMONE SILVA HIRAKI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ENES FURLANI JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ENES FURLANI JUNIOR
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sôcio Economia / Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. LILIANE SANTOS DE CAMARGOS
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Prof. Dr. ENO TIAGO DE OLIVEIRA
Departamento de Ciências Biológicas / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Usp

Data da realização: 26 de agosto de 2011.

DEDICO

À minha mãe **Elza Baltazar da Silva** a quem devo toda a minha vida e me educou para que eu me tornasse a mulher que sou hoje. Tu és minha heroína, minha “mulher maravilha”, uma verdadeira guerreira! Tenho orgulho de ser sua filha...

Ao meu pai **Mauro Massachi Hiraki**, o qual mesmo em silêncio, sempre acreditou no meu potencial.

À minha irmã **Monique Silva Hiraki**, minha “Nikinha”, que estava sempre presente e disposta nos momentos em que mais precisei, viajando quilômetros para me ajudar no laboratório. Te amo muito minha irmã.

Ao meu namorado **Luis Lessi dos Reis**, que mesmo chegando ao final deste trabalho, me acalmou e orientou nos momentos de aflição, dúvidas e inseguranças pelos quais passei.

À minha avó **Geni Baltazar da Silva** †, que mesmo longe deste plano, sei que olhas por mim.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida e pela força para enfrentar e vencer mais essa etapa.

A PETROBRAS e a FUNDUNESP pela parceria firmada e bolsa concedida.

Ao meu orientador prof. Dr. Enes Furlani Júnior pela confiança depositada, amizade, ideias e principalmente por sua paciência, em todos os momentos deste trabalho. Aprendi muito neste tempo em que trabalhamos juntos.

A profa. Dra. Liliane Santos de Camargos pelas ideias, correções, ensinamentos de técnicas e incentivos. Obrigada por ser minha guia e companheira na realização deste trabalho. Sou muito grata por tudo!

As professoras Dra. Kuniko Ywamoto Haga e Dra. Regina Monteiro de Castilho pelos equipamentos, laboratório e reagentes utilizados.

Ao professor Dr. Leandro Ferreira de Aguiar pela brilhante contribuição na banca examinadora do exame geral de qualificação.

Aos técnicos de laboratório: Alexandre Marques da Silva, Circélia dos Santos P. Souza Caetano e Selma Maria Bozzite Moraes pelos ensinamentos de técnicas laboratoriais essenciais à execução deste trabalho. A experiência de vocês enriqueceu grandemente este trabalho.

Aos alunos do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas Tássia Carolina Ferreira, Jailson Vieira Aguiar, Flávia, Ana Paula e a aluna do curso de graduação em agronomia Ângela de Castro. Por toda a ajuda na execução das análises laboratoriais. Agradeço pelas madrugadas que passamos juntos, sem vocês eu jamais faria este trabalho.

A todos os integrantes do grupo pinhão-manso da UNESP/Campus de Ilha Solteira que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho. Agradeço em especial aos colegas Samuel Ferrari, Elaine Renata de C. Viana Pereira, Gustavo Alves Pereira, Danilo Marcelo Aires dos Santos, Paulo Ricardo Theodoro da Silva, Henrique Daniel, Natália Barboza Zanon e Fabiana Alvão dos Santos que se dispuseram a trabalhar nos momentos solicitados.

A todos os professores ligados ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UNESP/ Campus de Ilha Solteira, pela confiança, ensinamentos e pela grande contribuição a minha carreira acadêmica.

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazerse que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade."

(Paulo Freire)

RESUMO

SOMBREAMENTO E APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE *Jatropha curcas* L.

Autora: SIMONE SILVA HIRAKI

Orientador: Prof. Dr. Enes Furlani Junior

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta conhecida e cultivada na América desde tempos remotos, porém, somente nas últimas três décadas passou a ser estudado agronomicamente. É considerada uma espécie promissora no processo de produção de biocombustíveis devido ao seu elevado teor de óleo nas sementes. Por tratar-se de uma planta ainda em fase de domesticação, os estudos acerca de seu crescimento e fisiologia ainda são escassos, porém necessários para a expansão da cultura em todo o país, por isso, o objetivo desta pesquisa foi analisar o crescimento e o metabolismo do nitrogênio de plantas jovens de *J. curcas* cultivadas sob quatro condições de sombreamento (0, 30, 50 e 70 % de cobertura) e quatro concentrações de nitrato (0, 15, 30 e 45 mM). Durante 120 dias as plantas foram tratadas e avaliadas biometricamente quanto à altura, diâmetro, número de folhas, área foliar e massas fresca e seca. Fisiologicamente analisou-se a atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase, proteína total solúvel, análise quantitativa de nitrato e amônia. Os resultados obtidos sugerem que com relação ao crescimento inicial *J. curcas* é responsiva ao sombreamento, como características ecofisiológicas que se refletem em adaptações morfológicas de expansão da área foliar, alongamento do pecíolo e maior crescimento em altura buscando ambientes com maior luminosidade, sendo que ambientes com sombreamento de 30% são eficazes no controle da temperatura foliar e retenção de água no substrato permitindo o melhor desenvolvimento das plantas, entretanto, níveis acima de 50% de sombreamento são prejudiciais ao crescimento inicial da espécie por provocarem intenso estiolamento e redução no número médio de folhas. A realização da adubação nitrogenada é de suma importância no desenvolvimento inicial das plantas, sendo os primeiros sintomas visuais de deficiência apresentados logo no primeiro mês após a germinação. Concentrações de nitrato superiores a 30 mM são prejudiciais por causarem redução em todos os parâmetros de crescimento analisados. Os tecidos foliares apresentaram as maiores médias de atividades das enzimas Redutase do nitrato e da Glutamina sintetase. A ausência de sombreamento proporcionou a maior atividade das duas enzimas analisadas demonstrando que em *J. curcas* a

maior luminosidade incidente beneficia o metabolismo e a assimilação do nitrogênio em compostos orgânicos tais como proteínas as quais também apresentaram teores mais elevados no mesmo tratamento. Concentrações acima de 30 mM podem acarretar em prejuízos para as plantas, pois além de prejudicar aspectos morfológicos de crescimento, reduz a atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em folhas e raízes. Os teores de proteína total solúvel em folhas e raízes aumentaram linearmente com o aumento das concentrações aplicadas.

Palavras chave: Pinhão-manso. Concentração de nitrato. Luminosidade. Alocação de fotoassimilados. Metabolismo do nitrogênio.

ABSTRACT

SHADE AND NITROGEN APPLICATION IN YOUNG PLANTS OF *Jatropha curcas* L.

Author: Simone Silva Hiraki

Adviser: Prof. Dr. Enes Furlani Junior

The jatropha (*Jatropha curcas* L.) is a plant known in America and cultivated since ancient times, but only in the last three decades began to be studied agronomy. It is considered a promising species for the biofuels production because its high oil content in seeds. It's a plant still under domestication because it, studies on their growth and physiology are still scarce, but necessary to the expansion of culture throughout the country, so the objective of this research was to analyze the growth and nitrogen metabolism in young plants of *J. curcas* grown under four conditions of shading (0, 30, 50 and 70% coverage) and four nitrate concentrations (0, 15, 30 and 45 mM). For 120 days the plants were treated and biometrically evaluated as to height, diameter, number of leaves, leaf surface area and fresh and dry mass. Physiologically, we analyzed the enzymes activity of the nitrate reductase and glutamine synthetase, total soluble protein, quantitative analysis of nitrate and ammonia. The results suggest that with respect to the initial growth *J. curcas* is responsive to the shading, with physiologic characteristics that reflected in morphological adaptations of leaf area expansion, petiole elongation and greater height growth looking environments with higher brightness, and shading environments with 30% are effective in leaf temperature control and water retention in the substrate allowing for better development of plants, however, levels above 50% shading is detrimental to early growth of the species to cause intense etiolation and reduction in the number of leaves. The nitrogen fertilizer is a paramount importance in the early development of plants, the start deficiency visual symptoms appear in the first month after germination. Nitrate concentrations exceeding 30 mM are harmful because they cause a reduction in all growth parameters analyzed. The leaf tissue had the highest average enzyme activities of nitrate reductase and glutamine synthetase. The absence of shading provided the highest activity of two enzymes analyzed demonstrating that in *J. curcas* most incident light benefits the metabolism and nitrogen assimilation in organic compounds such as proteins which also showed higher levels in the same treatment. Concentrations above 30 mM can

result in damage to plants, as well as morphological damage growth, reduces the activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in leaves and roots. The levels of total soluble protein in leaves and roots increased linearly with increasing concentrations applied.

Keywords: Jatropha. Nitrate concentration. Luminosity. Photoassimilates allocation. Nitrogen metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Visão geral de uma parcela experimental, logo após a implantação dos tratamentos.	40
Figura 2- Medidas lineares obtidas de folhas de pinhão-manso: nervura principal (P) representada pela linha vermelha e largura da folha (L), representada pela linha azul.....	41
Figura 3- Aspecto geral de <i>Jatropha curcas</i> L. cultivada sob 70% de sombreamento (a) e sem sombreamento (b). Observar aumento na área foliar, alongamento do pecíolo (setas) e aumento do diâmetro do caule.....	50
Figura 4- Metodologia de extração de compostos nitrogenados.	70
Figura 5- Soluções padrão para obtenção de curva padrão de nitrato.	71
Figura 6- Soluções padrão para obtenção da curva padrão de amônia.....	72
Figura 7- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) no tecido foliar, em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., em função dos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a) e 60 (b) dias após o início dos tratamentos (DAT).....	77
Figura 8- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) em raízes de <i>Jatropha curcas</i> nos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a), 90 (b) e 120 (c) dias após o início dos tratamentos.	78
Figura 9- Nitrato solúvel (NO_3^-) em folhas de <i>Jatropha curcas</i> função dos níveis de sombreamento testados aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos.....	81
Figura 10- Nitrato solúvel (NO_3^-) em raízes de <i>Jatropha curcas</i> função dos níveis de sombreamento testados aos 60 (a) e 90 (b) dias após o início dos tratamentos.....	82
Figura 11- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) em folhas de <i>Jatropha curcas</i> cultivadas em função das concentrações de nitrato aplicadas, aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos.	84
Figura 12- Concentração de nitrato foliar em <i>Jatropha curcas</i> L., aos 60 dias após início dos tratamentos, em função das concentrações de nitrato aplicadas.	85

Figura 13- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) em raízes de <i>Jatropha curcas</i> L. em função das concentrações de nitrato aplicadas, aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) dias após o início dos tratamentos.....	86
Figura 14- Nitrato solúvel em raízes de plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L. em função das concentrações de nitrato aplicadas em solução nutritiva aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos.....	87
Figura 15- Comportamento da atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) em folhas de plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., em função das dos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos. ..	90
Figura 16- Concentração de amônia (NH ₄ ⁺) em folhas (a) e raízes (b) de plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., em função dos níveis de sombreamento testados.....	93
Figura 17- Atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) em folhas aos 60 dias após o início dos tratamentos (DAT) (a), e em raízes aos 30 (b) e 90 (c) DAT em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L. em função das concentrações de nitrato aplicadas.	94
Figura 18- Concentração de amônia (NH ₄ ⁺) em folhas aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) DAT e em raízes aos 120 DAT (d) de plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> , função das concentrações de nitrato aplicadas.....	97
Figura 19- Teores foliares de proteína total solúvel em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> em função dos níveis de sombreamento testados aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) DAT.....	102
Figura 20- Teores de proteína total solúvel em raízes de plantas jovens de <i>Jatropha. curcas</i> em função dos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a), 60 (b) e 120 (c) DAT.	103
Figura 21- Teores de proteína total solúvel em folhas de <i>Jatropha curcas</i> em função das concentrações de nitrato aplicadas, aos 30 (a), 60 (b) e 120 (c) DAT.....	104
Figura 22- Teores de proteína total solúvel em raízes de <i>Jatropha curcas</i> em função das concentrações de nitrato aplicadas aos 60 (a) e 120 (b) DAT.	105
Figura 23- Desdobramento da interação sombreamento X concentração de nitrato no tecido foliar aos 30 dias após o início dos tratamentos em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L.	106

Figura 24- Desdobramento da interação sombreamento X concentração de nitrato no tecido foliar aos 60 dias após o início dos tratamentos em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L.	107
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Médias de altura, diâmetro do coleto, relação altura/ diâmetro do coleto (H/DC), número de folhas, comprimento do pecíolo (Pecíolo), área foliar, Teste F e diferença mínima significativa (DMS) em *J. curcas* obtidas nos quatro períodos de permanência em casa de vegetação após o início dos tratamentos (DAT).43
- Tabela 2- Médias de altura, diâmetro do coleto (Diâmetro), número de folhas, comprimento do pecíolo (Pecíolo), área foliar (Área), relação altura/diâmetro do coleto (H/DC), Teste F, R^2 e equação de regressão, nos níveis de sombreamento testados (Sombr.), aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT), em *J. curcas*.46
- Tabela 3- Correlação entre altura, diâmetro do coleto, número de folhas, comprimento do pecíolo e área foliar, em plantas jovens de *J. curcas*, nos quatro períodos analisados.49
- Tabela 4- Médias de massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca do sistema radicular (MFR), massa seca do sistema radicular (MSR), porcentagem de água na parte aérea (H_2O PA) e nas raízes (H_2O R), e comprimento da raiz principal (CR) em *Jatropha curcas* L., nos níveis de sombreamento testados (Sombr.), Teste F, R^2 e equações de regressão, ao final do período experimental.51
- Tabela 5- Médias de altura, diâmetro, número de folhas, comprimento do pecíolo (Pecíolo), área foliar (Área), relação altura/diâmetro do coleto (H/DC), Teste F, R^2 e equação de regressão, em função das concentrações de nitrato aplicadas (Concen.), aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT), em *Jatropha curcas* L.54
- Tabela 6- Correlações entre altura, diâmetro do coleto, nº de folhas, comprimento do pecíolo, área foliar, comprimento da raiz principal (Raiz), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) e massa seca total, em plantas jovens de *J. curcas* ao final do período experimental..55
- Tabela 7- Médias de massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca do sistema radicular (MFR), massa seca do sistema radicular (MSR), porcentagem de água na parte aérea (H_2O PA) e nas raízes (H_2O R), e

comprimento da raiz principal (CR) em <i>Jatropha curcas</i> L., nas concentrações de nitrato aplicadas, Teste F, R ² e equações de regressão, ao final do período experimental.	58
Tabela 8- Valores do teste F e média geral da atividade da enzima redutase do nitrato em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira SP – 2010.....	75
Tabela 9- Valores do teste F e média geral dos teores de nitrato presentes nos tecidos foliares e radicular em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.....	80
Tabela 10- Valores do teste F e média geral da atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) nos tecidos foliar e radicular em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.	89
Tabela 11- Valores do teste F e média geral dos teores de amônia (NH ₄ ⁺) nos tecidos foliares e radicular em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.....	91
Tabela 12- Correlações lineares entre altura, diâmetro do coleto, número de folhas, área foliar, atividade da redutase do nitrato no tecido foliar (RN), atividade da glutamina sintetase no tecido foliar (GS) e proteína total solúvel no tecido foliar, em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., durante o período experimental. Ilha Solteira – SP, 2010.	98
Tabela 13- Correlações entre comprimento da raiz principal (Raiz), massas fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), massas seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST), atividade da redutase do nitrato no tecido foliar (RN folhas) e nas raízes (RN raízes), atividade da glutamina sintetase no tecido foliar (GS folhas) e nas raízes (GS raízes), proteína solúvel nas folhas (Proteína F) e raízes (Proteína R) em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L. ao final do período experimental. Ilha Solteira – SP, 2010.	99
Tabela 14- Valores do teste F e média geral dos teores proteína total solúvel nos tecidos foliar e radicular em plantas jovens de <i>Jatropha curcas</i> L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.....	100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Características gerais da espécie <i>Jatropha curcas</i> L.	19
3.2 Importância econômica	20
3.3 Aspectos gerais do metabolismo do nitrogênio	21
3.4 Atividade da redutase do nitrato (RN).....	24
3.5 Atividade da glutamina sintetase (GS).....	25
3.6 Influência do sombreamento na fisiologia e crescimento das plantas	27
4. REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 1	35
ALOCAÇÃO DE FOTOASSIMILADOS EM PLANTAS JOVENS DE <i>Jatropha curcas</i> L. SOB NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E CONCENTRAÇÕES DE NITRATO	35
1. RESUMO	36
2. ABSTRACT	37
3. INTRODUÇÃO	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Descrição dos tratamentos	39
4.2 Descrição das variáveis avaliadas.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Estudo do tempo de permanência em casa de vegetação	43
5.2 Partição de fotoassimilados em função do sombreamento em <i>J. curcas</i>	45
5.3 Partição de fotoassimilados em função das concentrações de nitrato aplicadas em <i>J. curcas</i>	53
6. CONCLUSÕES.....	59

7. REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 2	64
ATIVIDADE DAS ENZIMAS REDUTASE DO NITRATO E GLUTAMINA SINTETASE EM PLANTAS JOVENS DE <i>Jatropha curcas</i> L. SOB NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E CONCENTRAÇÕES DE NITRATO.....	64
1. RESUMO	65
2. ABSTRACT	66
3. INTRODUÇÃO	67
4. MATERIAL E MÉTODOS	68
4.1 Descrição dos tratamentos	68
4.2 Descrição das variáveis avaliadas	69
4.3 Análise dos dados.....	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES.....	108
7. REFERÊNCIAS	108

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos dois choques do petróleo, em 1973 e 1979, o Brasil sofreu o impacto da elevação dos preços, principalmente porque havia uma forte dependência, materializada na importação de 80% do óleo bruto então consumido no País. A partir do novo patamar de preços e das necessidades de crescimento econômico e desenvolvimento industrial, o País adotou duas grandes estratégias para contornar a crise: investimentos para aumento da produção doméstica de petróleo e a implementação do Proálcool, o maior e mais bem-sucedido programa de substituição de combustíveis derivados de petróleo do mundo.

Foi então, a partir da década de 90, que novos testes, implantação de plantas industriais e produção em escala comercial dos biocombustíveis começaram a ser impulsionadas, visando principalmente o meio ambiente e a procura de um novo combustível competitivo com o petróleo. Hoje, a matriz energética brasileira é a que conta com a maior participação de fontes de energias renováveis, um verdadeiro exemplo de sustentabilidade.

Com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel e o surgimento de grande demanda por óleos vegetais, culturas como soja, milho, mamona, girassol, amendoim, algodão, palma, dendê e pinhão-manso, ganharam destaque no cenário nacional e têm sido divulgadas como alternativas para fornecimento de matéria-prima no setor de biocombustíveis, além da já comumente utilizada cana-de-açúcar, fonte de etanol.

Das culturas citadas, o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) destaca-se das demais por ser uma planta nativa com elevado teor de óleo em suas sementes e que não compete por áreas de produção alimentícias como outras culturas. Além disso, é uma planta que apresenta resistência à seca e à salinidade e tem sido amplamente divulgada como uma cultura promissora para a produção de biocombustíveis especialmente em áreas do semiárido brasileiro. Embora seja uma planta conhecida e cultivada na América desde tempos remotos, e disseminada por todas as áreas tropicais, ainda se encontra em processo de domesticação e somente nas últimas três décadas passou a ser estudada agronomicamente. Assim seu plantio em áreas extensas causa ainda grande apreensão aos pesquisadores e produtores, pois o conhecimento técnico acerca desta espécie é ainda insipiente.

Paralelamente às pesquisas de técnicas agrícolas, é necessário o desenvolvimento pesquisas básicas sobre o conhecimento do metabolismo, o qual dá a base teórica sólida para o manejo adequado das culturas e desenvolvimento de novas tecnologias adequadas às nossas condições. Caso contrário, não saberemos o que fazer com conhecimentos tão específicos

como, por exemplo, a sequência e localização dos genes num determinado cromossomo, ou como aprimorar programas de manejo e adubação, pois nem mesmo teremos compreendido claramente o comportamento do metabolismo primário, que é o que governa o desenvolvimento e produção da planta.

O nitrogênio (N) é um dos fatores mais limitantes para o crescimento das plantas, e seu metabolismo é o segundo maior processo metabólico vegetal, superado apenas pela fotossíntese. O metabolismo deste nutriente envolve complexos sistemas de absorção, assimilação e mobilização nem sempre são compreendidos em todas as espécies. Trata-se do nutriente mais dispendioso e altamente exigido em diversas culturas, sendo apontado como o nutriente exigido em maior quantidade no desenvolvimento inicial de *J. curcas* (LAVIOLA; DIAS, 2008).

Dentre as enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio destacam-se a redutase do nitato (RN) e a glutamina sintetase (GS). A primeira (RN) é a principal enzima responsável pela redução de N pelas plantas assumindo, portanto, papel de extrema importância no metabolismo vegetal. A estimativa de sua atividade tem sido utilizada com sucesso como parâmetro indicativo da resposta fisiológica de plantas submetidas a condições adversas (MEGURO; MAGALHÃES, 1983). A GS é a enzima responsável pela catalisação o amônio, componente tóxico à célula, que é liberado durante a redução do nitrato efetuada pela enzima RN, fixando o N em aminoácidos. Fatores como a quantidade de nitrato disponível, a luz e os carboidratos interferem diretamente no metabolismo do nitrogênio, tanto em níveis de transcrição como de tradução (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Diversos autores descreveram mudanças no metabolismo do nitrogênio, principalmente em plantas de café (*Coffea arabica* L.) tratadas com diferentes níveis de sombreamento e doses de N (CARELLI; FAHL, 2006; ANDRADE NETTO, 2005; CARELLI et al., 1990). Entretanto, para a espécie *J. curcas* ainda há poucos estudos sobre os efeitos destes fatores sobre seu crescimento e metabolismo.

Tendo em vista os argumentos mencionados sobre a importância do estudo do metabolismo do nitrogênio e levando-se em consideração os poucos estudos publicados sobre *J. curcas*, o presente trabalho teve como finalidade estudar os efeitos de diferentes níveis de sombreamento e a aplicação de concentrações de nitrato em plantas jovens de *J. curcas*, obtendo informações básicas sobre o crescimento inicial e atividade de algumas enzimas do metabolismo do nitrogênio em plantas submetidas à esses tratamentos.

Para facilitar a compreensão dos vários itens estudados durante essa pesquisa, o trabalho foi subdividido em dois capítulos, a saber:

- Capítulo 1: Alocação de fotoassimilados em plantas jovens *Jatropha curcas* L. sob níveis de sombreamento e concentrações de nitrato.
- Capítulo 2: Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em plantas jovens de *Jatropha curcas* L. sob níveis sombreamento e concentrações de nitrato.

2. OBJETIVOS

- Analisar o crescimento inicial de *J. curcas* cultivada sob níveis de sombreamento e concentrações de nitrato.
- Avaliar as atividades das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase nos tecidos foliar e radicular de *J. curcas* correlacionando-as com a intensidade luminosa e quantidade de nitrogênio aplicada.
- Fornecer informações básicas sobre aspectos relacionados ao metabolismo e crescimento de plantas jovens de *J. curcas*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características gerais da espécie *Jatropha curcas* L.

A família Euphorbiaceae possui cerca de 317 gêneros e 8000 espécies, distribuindo-se principalmente nos trópicos e subtropicais (CRONQUIST, 1981). Entre essas espécies, está *Jatropha curcas* L. que trata-se de um arbusto grande, de crescimento rápido, cuja altura varia frequentemente de dois a três metros, podendo alcançar até cinco metros. As folhas são decíduas, alternadas e subopostas, filotaxia em espiral, cada folha dista 105° da próxima, os pecíolos são longos e esverdeados, dos quais partem as nervuras divergentes, e no final da época seca ou durante a estação fria, as folhas caem, em parte ou totalmente (SATURNINO et al., 2005). O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20 cm, possui poucas ramificações, caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente; floema com longos canais que se estendem até as raízes, nos quais circula o látex (ARRUDA et al., 2004). As flores da espécie são pequenas, amarelo-esverdeadas e o fruto é uma cápsula com três sementes escuras e lisas (MARTINS et al., 2008). A semente do pinhão-manso pesa de 0,48 a 0,72 g e fornece de 50 a 52% de óleo extraído com solventes e 32 a 35% em caso de extração

por trituração e aquecimento da amêndoa (BRASIL, 1985). O gênero *Jatropha* apresenta polinização entomófila, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de variabilidade genética dentro das espécies (SATURNINO et al., 2005).

Peixoto (1973) julga que o pinhão-manso seja oriundo da América do Sul, Brasil e ainda das Antilhas, e que foi introduzida em 1783, nas Ilhas do Arquipélago de Cabo Verde, alcançando depois a África e a Índia, e posteriormente disseminada por todas as regiões tropicais, em menor proporção, nas regiões frias. Já Heller (1996) alega que o pinhão-manso originou-se no México e América Central, mas que é cultivado em muitos outros países latino americanos, africanos e asiáticos como cerca viva e que foi um importante produto de exportação nas Ilhas de Cabo Verde durante a primeira metade do século passado. Porém, esse mesmo autor relata que as informações sobre o país de sua origem ainda não são totalmente claras, visto que vários trabalhos relatam origens diferentes da espécie, e que apesar de diversos cientistas terem tentado definir a origem de *J. curcas*, a sua fonte continua bastante controversa. O fato é que o pinhão-manso é encontrado em quase todas as regiões intertropicais, estendendo sua ocorrência à América Central, Índia, Filipinas e Timor, até mesmo às zonas temperadas. A espécie ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil, sempre de forma dispersa e adaptando-se às mais diversas condições edafoclimáticas, propagando-se, sobretudo, nos estados do Nordeste, assim como em Goiás e Minas Gerais e, de modo geral, crescendo nos terrenos abandonados e não cultivados, não subsistindo, porém, nos locais de densa vegetação, com a qual dificilmente consegue competir (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS- EPAMIG, 2005).

3.2 Importância econômica

J. curcas é uma planta com muitos atributos, múltiplos usos e considerável potencial, relata-se o uso para prevenção e controle de erosão do solo, recuperação do solo e como cerca viva (JONGSCHAAP et al., 2007). Tong et al. (2006) acrescentam que a espécie, também é utilizada para produzir sabão, cosméticos, pesticidas e medicamentos anticancerígenos. Há diversos relatos do uso do óleo e sementes de pinhão-manso em lamparinas e candeeiros, por ser inodoro e ao ser queimado não produzir fumaça (SATURNINO et al., 2005). Porém, o principal aspecto positivo se refere à produção de óleo para produção de biocombustível com a vantagem de armazenamento das sementes por longos períodos de tempo, sem os inconvenientes da deterioração do óleo por aumento da acidez livre, como acontece com os frutos de dendê, por exemplo (SLUSZZ; MACHADO, 2006). *J. curcas* apresenta uma grande

vantagem em relação a outras culturas pois ela se adapta a variadas condições externas, como por exemplo, solos contaminados por metais pesados e de alta salinidade, além de ser tolerante à seca (KUMAR et al., 2008).

O pinhão-manso leva de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que se estende por 40 anos, e produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare, o que se reflete de forma positiva para o cultivo da espécie (CUNHA, 2009). É utilizado industrialmente no arquipélago de Cabo verde, em Angola, Guiné, Moçambique, Antilhas Britânicas, Filipinas, México, Porto Rico, Venezuela e El Salvador, sempre em consórcio com outras culturas (PEIXOTO, 1973). Atualmente, a Índia vem se destacando na cultura do pinhão-manso. Segundo Saturnino et al. (2005), esse país vem desenvolvendo um grande programa de pesquisa com essa espécie, entre outras oleaginosas, visando produção de biodiesel. No Brasil, com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel e o surgimento de grande demanda por óleos vegetais, a espécie tem sido divulgada como uma alternativa para fornecimento de matéria-prima. Esta escolha se baseia na expectativa de que a planta tenha baixo custo de produção e seja resistente ao estresse hídrico, o que seria uma vantagem significativa principalmente na região semiárida do país (BELTRÃO et al., 2007). Além disso, por tratar-se de uma cultura relativamente nova, não foi ainda desenvolvida técnicas de colheita mecanizada, necessitando assim de mão-de-obra braçal, beneficiando principalmente a agricultura familiar.

3.3 Aspectos gerais do metabolismo do nitrogênio

O nitrogênio (N) é o nutriente mais dispendioso e o único exigido em grande quantidade para a maioria das culturas. Ainda que presente em altos níveis nos solos, a quantidade de N na forma mineral é geralmente baixa. No ecossistema natural há perda contínua de N, não só devido à absorção deste pelas plantas, mas também por lixiviação, volatilização e desnitrificação (PEOPLES et al., 1995).

No solo o N encontra-se nas formas orgânicas (restos culturais e matéria orgânica), mineral (nitrato - NO_3^- e amônia - NH_4^+) e em formas gasosas combinadas (NH_3^+ , N_2O e NO). Da quantidade total de N presente no solo, apenas 2% encontra-se disponível às plantas. (HAVLIN et al., 2005; SODEK, 2004). Nas plantas o N representa de 1 a 6% da sua matéria seca absorvido sob diferentes formas, que incluem: absorção pelas folhas de pequenas quantidades de NH_3^+ , fixação biológica do N_2 atmosférico pelas leguminosas, absorção de NH_4^+ pela mineralização da matéria orgânica e adubos nitrogenados, absorção de aminoácidos

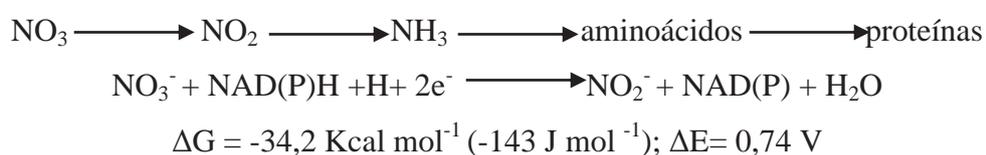
presentes na solução do solo pelas raízes e folhas (MALAVOLTA, 2006; SODEK, 2004). As formas preferenciais de N absorvidas pelas plantas são aquelas mais abundantes na solução do solo, NO_3^- e NH_4^+ (TAIZ; ZEIGER, 2009; SODEK, 2004).

O NO_3^- é a forma predominante de N no solo, pois em condições de boa drenagem e altas temperaturas o amônio proveniente da mineralização da matéria orgânica e/ou solubilização de alguns fertilizantes nitrogenados, é rapidamente nitrificado. Em períodos de baixas temperaturas e umidade associada, o processo de nitrificação é limitado, levando a um acúmulo de nitrogênio amoniacal nos solos, sendo este usado para síntese de aminoácidos e proteínas, quando absorvido pelas plantas (HAVLIN et al., 2005).

Independentemente das formas de N disponíveis no solo para absorção pelas plantas, algumas espécies condicionadas por fatores como idade, variáveis ambientais e genéticas, tornam-se mais sensíveis à absorção e acúmulo de algumas formas de N. Segundo Fernandez (1990), em estudo realizado com duas variedades de arroz sob combinação de luz e temperatura, fornecendo diferentes fontes de N para as plantas (sulfato de amônio e nitrato de cálcio), verificou-se maior acúmulo de matéria fresca nas plantas que receberam fontes nítricas de N. Para as plantas que receberam fontes amoniacais houve diminuição do peso de massa fresca e acúmulo de aminoácidos livres, com intensa mobilização de cadeias de carbono para evitar o efeito tóxico do NH_4^+ livre, colocando-se sob a forma de amidas com grande deslocamento de carboidratos para as raízes.

O nitrato é um poderoso competidor pela energia disponível nas raízes, de tal forma que, em plantas cultivadas em alto nível de nitrato, o teor de açúcares e o crescimento do sistema radicular são bem inferiores aos daqueles crescidos em baixo teor de nitrato, ou outras formas de nitrogênio, pois o custo energético para a assimilação de nitrato nas raízes é quase o dobro daquele observado em tecidos verdes na luz. Isso ocorre porque nas raízes toda a energia necessária para converter nitrato em aminoácidos deriva da oxidação dos carboidratos ou ácidos orgânicos translocados da parte aérea, enquanto, nas folhas, parte desse processo está acoplado diretamente com as reações da luz que ocorrem nos cloroplastos (SCHRADER; THOMAS, 1981, citado por CARELLI; FAHL, 1991).

As plantas assimilam a maioria do nitrato absorvido por suas raízes em compostos orgânicos nitrogenados, como segue: primeiro ocorre a redução do nitrato a nitrito no citoplasma, pela enzima redutase do nitrato (RN), conforme a seguinte reação:



Em que, NAD(P)H indica NADH ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A assimilação redutiva do N é um processo dispendioso energeticamente às plantas, razão porque ocorre, predominantemente, nas folhas, centro da síntese de energia (ATP) e agentes redutores (fornecedores de elétrons). O processo de incorporação do N compete com a fotossíntese por carboidrato e energia, consumindo 12 ATPs para cada N assimilado pela planta (EPSTAIN; BLOOM, 2006).

A forma mais comum da RN utiliza somente o NADH como doador de elétrons, enquanto a outra forma da enzima encontrada, predominantemente, em tecidos não clorofilados, como raízes, pode usar tanto o NADH quanto o NADPH. As duas formas de RN das plantas superiores são constituídas de três subunidades idênticas, com três grupos prostéticos cada: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o grupo heme e o complexo molibdênio, onde são transferidos para nitrato (SODEK, 2004).

Entre os fatores que regulam a RN nas plantas está o nitrato, a luz, os carboidratos, e as proteínas que atuam na transcrição e tradução (TAIZ; ZEIGER, 2009; SODEK, 2004) e também por uma modulação pós-traducional. A atuação da luz e dos carboidratos se dá pela estimulação da proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos de serina da proteína RN, promovendo a sua ativação (KAISER; HUBER, 2001).

O nitrito é um íon altamente reativo e potencialmente tóxico. As células vegetais transportam rapidamente o nitrito que foi originado na redução do nitrato do citossol para o interior dos cloroplastos das folhas e nos plastídeos das raízes. Nessas organelas, a enzima nitrito redutase (NiR) reduz o nitrito a amônio (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Altos níveis de NH_4^+ são tóxicos às plantas, pois este íon pode dissipar os gradientes de prótons trans-membrana requerido tanto para o transporte elétrico fotossintético quanto respiratório e para isolamento de metabólitos nos vacúolos (TAIZ, ZEIGER, 2009).

O amônio derivado da absorção pela raiz, ou produzido por assimilação do nitrato ou da fotorrespiração, é convertido a glutamina e glutamato pelas ações sequenciais da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), que estão localizadas no citossol e nos plastídeos das raízes ou dos cloroplastos, respectivamente (TAIZ; ZEIGER, 2009). Uma vez assimilado em glutamina ou glutamato, o N pode ser transferido para outros compostos orgânicos por meio de diversas reações incluindo a transaminação. A interconversão entre glutamina e asparagina sintase equilibra o metabolismo do carbono e do N (CORUZZI; BUSH, 2001).

3.4 Atividade da redutase do nitrato (RN)

A RN é considerada 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 nas raízes ou na parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O fluxo catalítico da RN ou a capacidade total de redução do nitrato pelas plantas depende: da disponibilidade de substrato no citoplasma (concentração em estado de equilíbrio do NADPH e nitrato); do nível de RN funcional – quantidade de RN polipeptídica e da disponibilidade de cofatores e íons metálicos, FAD, heme, Fe, Mo-MPT (molibdênio-molibdopterina) e molibdênio; e da intensidade da atividade da RN funcional (TAIZ; ZEIGER, 2009; SODEK, 2004).

A RN responde também à diferenças de temperatura nas diferentes épocas do ano e ao local de aplicação do fertilizante nitrogenado. Nas estações mais quentes, e com temperatura do ar mais elevada, as maiores atividade da RN foram registradas nas folhas, já no frio destaca-se a atividade nas raízes (FREITAS et al., 2007). Alguns trabalhos têm mostrado diferenças na atividade da RN entre partes da planta, destacando, normalmente, parte aérea e sistema radicular. Há registros também de diferenças entre RN de bainhas e folhas de *Brachiaria* sp. (FERNANDES et al., 1978).

A luz e o nitrato são importantes fatores na indução e manutenção da atividade da enzima RN em tecidos vegetais. A RN é uma enzima induzível pelo substrato, e acredita-se que a taxa de influxo de nitrato para o sítio de indução seja um dos principais fatores no controle do nível da enzima nos tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Uma das linhas de evidência sugere que o papel da luz na indução da atividade da RN está relacionado diretamente com a fotossíntese ou com a produção de carboidratos para fornecer a energia necessária ao processo de redução de nitrato. Outra linha de evidência sugere que o efeito da luz na atividade da RN seria através da modulação da disponibilidade de nitrato para a enzima. Desse modo, a luz aumentaria a absorção pelas raízes e o fluxo de nitrato para as folhas via corrente transpiratória, e também a permeabilidade de membrana, possibilitando o movimento de nitrato do vacúolo para o sítio de ação da enzima localizada no citoplasma (CARELLI et al., 1990).

Segundo Sodek (2004) a luz influi indiretamente na atividade da RN na folha, provocando mudanças numa série de íons e metabólitos envolvidos nesse mecanismo de regulação. Com a fotossíntese, ocorre aumento no teor de açúcares fosforilados (como triose

P) e queda em fosfato inorgânico (em função do aumento em ATP, por exemplo), proporcionando condições favoráveis para a ativação da RN. A luz também está envolvida na regulação da RN a nível de transcrição (via fitocromo). A oscilação diária de atividade entre os períodos de luz e escuro continua quando a planta é transferida para luz contínua, comprovando que a enzima obedece a ritmo circadiano. Outros fatores que influenciam na síntese da RN são o gás carbônico, sacarose e alguns metabólitos nitrogenados, estando o NO_3^- entre os mais importantes. O NO_3^- tem uma forte influência sobre todos os componentes da assimilação de nitrogênio. Além da própria RN, ele regula as proteínas de transporte, e as enzimas redutase do nitrito, glutamina sintetase (GS) e sintase do glutamato (GOGAT) (SODEK, 2004).

Segundo Carelli et al. (1990) vários autores demonstraram que a atividade da RN, nas folhas de numerosas espécies, apresenta flutuações diárias, com um pico máximo ao redor do meio-dia, mas, de modo geral, aumenta durante as horas de luz e decresce no escuro (HARPER; HAGEMAN, 1972; NICHOLAS et al., 1976; LEWIS et al., 1982; LILO, 1983, 1984; HIPKIN et al., 1984, citados por CARELLI et al., 1990). Os mesmos autores demonstraram que plantas cultivadas a pleno sol apresentaram menor atividade da RN em relação às plantas sombreadas, embora possuíssem teores elevados de açúcares totais (fonte de energia) e de nitrato (substrato), indicando que a menor atividade da RN nas plantas cultivadas em pleno sol aparentemente não foi devida a limitações na disponibilidade de nitrato e de açúcares para fornecer a energia necessária para a redução de nitrato, mas sim ao efeito da luz.

LEMOS et al. (2007) observaram que no período de maior irradiância, a maior atividade enzimática da RN foi observada no sistema agroflorestal quando comparado com o sistema a pleno sol, afirmando que maior atividade RN foi observada no sistema sombreado (café x ingá) em relação aos cafeeiros cultivados a pleno sol, quando analisado no terço superior, pois a restrição da radiação luminosa promovida pela presença das árvores condicionou um microclima favorável a atividade da enzima.

3.5 Atividade da glutamina sintetase (GS)

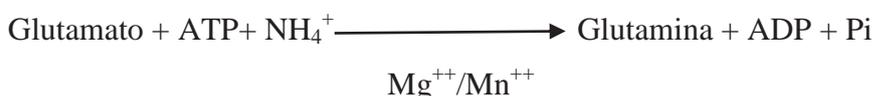
A GS foi primeiramente purificada e caracterizada em plantas em 1956. Sua característica é a alta afinidade por NH_4 o que favorece a incorporação em compostos orgânicos. Originalmente, a glutamina foi considerada um doador de N-amida somente para uma limitada quantidade de compostos. Porém, a descoberta da NAD(P)H glutamato sintase

em bactéria e posteriormente glutamato sintase dependente de ferredoxina em plantas, estabeleceu-se uma rota, conhecida como ciclo do glutamato sintase, na qual o amônio é convertido a compostos orgânicos pela assimilação via sintetase da glutamina (TAIZ; ZEIGER, 2009).

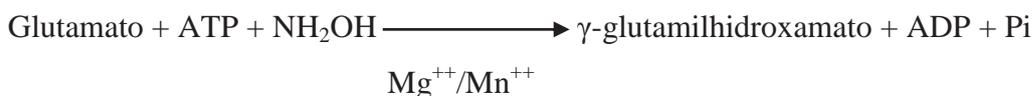
O amônio produto do processo de redução do nitrato não pode ser acumulado, portanto, deve ser rapidamente assimilado, ou seja, incorporado em compostos orgânicos evitando seu acúmulo nos tecidos. A enzima responsável é a GS, que catalisa a união do NH_4^+ com o ácido glutâmico para formar glutamina, a qual é altamente eficiente. Dessa forma, em condições normais, o NH_4^+ é mantido em concentrações baixas em tecido foliar (MIFLIN et al., 1981).

Conforme mostrado a seguir, a GS utiliza glutamato, ATP e amônia com conseqüente produção de glutamina, ADP e Pi (Reação 1). Além da atividade sintetase, a GS funciona também biossinteticamente produzindo γ - glutamilhidroxamato a partir de glutamato, ATP e hidroxilamina (Reação 2). Funciona também como transferase produzindo γ - glutamilhidroxamato a partir de glutamina e hidroxilamina (Reação 3) (FARDEM; ROBERTSON, 1980).

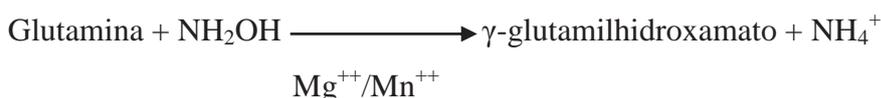
Reação 1:



Reação 2:



Reação 3:



A principal rota de assimilação do N-amoniaco (NH_4^+) pelas plantas se dá por meio da atividade da GS, a qual ocorre em diferentes isoformas e localizações na planta (McNALLY et al., 1983; HIREL et al., 1984).

Estruturalmente a GS é composta, predominantemente, de oito subunidades, resultando num arranjo octamérico. Cada subunidade tem massa molecular em torno de 47

kDa que resulta numa massa molecular total da enzima igual a 380 kDa. Há indício de que existam duas isoformas da enzima GS nas plantas, uma localizada no citoplasma (GS1) e outra no cloroplasto ou plastídeo (GS2) (ROBERT; WONG, 1986). Sugeriu-se que a enzima GS1 possui função de assimilação da amônia no citossol em condições de escuro (McNALLY et al., 1983). A enzima GS2 das folhas é induzida pela luz e o íon NH_4^+ , estando envolvida, também, no uso do NH_4^+ da fotorrespiração (EDWARDS; CORUZZI, 1989).

A enzima GS, localizada nos plastídeos das raízes, forma N-amida consumido *in loco*, enquanto a GS dos cloroplastos foliares reassimila o N na forma amoniacal (NH_4^+) formado durante a fotorrespiração. A quantidade de carboidrato e de radiação influencia a expressão das formas dessa enzima presente nos plastídios, sem efeito sobre as formas citossólicas (LAM et al., 1996).

De maneira semelhante à RN, a regulação da atividade da GS pode ser induzida por diferentes estímulos externos ou fisiológicos, dependendo do órgão da planta ou da isoforma da enzima (PUJADE-RENAUD et al., 1994). A luz, por exemplo, aumenta a quantidade de RNAm da enzima GS2 em folhas de ervilha, fumo e tomate (BECKER et al., 1992). Edwards e Coruzzi (1989) observaram que a expressão de um gene nuclear para GS2 é afetada, sensivelmente pela luminosidade. Tjaden et al. (1995) descreveram a flutuação da atividade da enzima GS2 conforme a quantidade de radiação e da atividade da RN, observando aumentos da GS na presença de luz concomitantemente ao aumento da atividade da RN.

3.6 Influência do sombreamento na fisiologia e crescimento das plantas

Fatores como luz, temperatura, água e condições edáficas são alguns componentes do meio que influenciam, de maneira decisiva, o desenvolvimento da vegetação. Portanto, o suprimento inadequado de um desses componentes ou fatores pode reduzir o vigor da planta e limitar o seu desenvolvimento. Dentre esses fatores, a luz, especialmente nos planos qualitativo e quantitativo, age regulando vários processos do desenvolvimento, como a taxa de fotossíntese, biossíntese de pigmentos, assimilação de nitrogênio e anatomia foliar, entre outros processos (LIMA JUNIOR et al., 2006).

O ambiente de luz em que a planta cresce é de fundamental importância, pois a adaptação das plantas a este ambiente depende do ajuste do seu aparelho fotossintético de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível (ENGEL; POGGIANI, 1991 citados por GUIMARÃES et al., 2007). Entre os diversos componentes do ambiente, a luz é primordial para o crescimento das plantas, não só por

fornecer energia para a fotossíntese, mas também por fornecer sinais que regulam seu desenvolvimento por meio de receptores de luz sensíveis a diferentes intensidades, qualidade espectral e estado de polarização. Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade, aos quais uma espécie está adaptada, podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento. O sombreamento artificial é um método utilizado no estudo das necessidades luminosas das diferentes espécies em condições de viveiro, pois isola e quantifica o efeito da intensidade luminosa e fornece às parcelas experimentais condições uniformes de iluminação, quando comparada aos estudos em condições naturais (REGO; POSSAMAI, 2006).

O crescimento e a adaptação da planta a diferentes ambientes relacionam-se à sua eficiência reprodutiva, que está associada, entre outros fatores, aos teores de clorofila foliar. Os teores de clorofila e carotenóides nas folhas são utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa e ao crescimento e à adaptação a diversos ambientes. Uma planta com alto teor de clorofila é capaz de atingir taxas fotossintéticas mais altas, pelo seu valor potencial de captação de “quanta” na unidade de tempo. Em experimento com mudas de Jequitibá rosa (*Cariniana legalis* Mart.) expostas a cinco níveis de sombreamento, Rego e Possamai (2006) verificaram que os níveis de clorofila são afetados pelos diferentes níveis de irradiância na folha. Verificou-se que o aumento da clorofila b nas folhas submetidas a baixa luminosidade é uma característica importante, porque a clorofila b capta energia de outros comprimentos de onda e a transfere para a clorofila a, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese e representa um mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa. Resultados semelhantes, com relação aos níveis de clorofila também foram relatados por Martinazzo et al. (2007) em experimento utilizando-se mudas de *Eugenia uniflora* Linn.

Em estudos realizados por Lima Junior et al. (2006), os resultados indicaram maior taxa fotossintética e ainda, incrementos na condutância estomática, espessura do limbo, número de estômatos por área e espessura de parede celular em folhas de plantas de café crescendo sob pleno sol e 30% de sombreamento. Os mesmos autores citam que alterações na estrutura interna foliar constituem aspectos decisivos na capacidade de aclimação das espécies expostas a diferentes condições de ambiente, e as características fotossintéticas geralmente variam em resposta a diferentes regimes de irradiância. Folhas de árvores crescendo num ambiente de sombra apresentam modificações nas características fotossintéticas, bioquímicas, organização de células do mesofilo e frequência estomática

quando comparadas com folhas crescendo num ambiente de maior irradiância, sendo que tais características foram também verificadas experimentalmente. Também estudando mudas de cafeeiro, Freitas et al. (2003) notaram que a fotossíntese, condutância estomática, transpiração, eficiência fotoquímica do PSII apresentaram variações significativas em função dos quatro níveis de sombreamento testados (30, 50, 70% e a pleno sol).

Não só características anatômicas são modificadas pelos diferentes níveis de sombreamento. Diversos autores relataram aumentos na área foliar relacionados ao aumento do sombreamento nas mais diferentes espécies [*Jacaranda copaia* (UCHIDA; CAMPOS, 2002); *Cariniana legalis* (REGO; POSSAMAI, 2006); *Trema micranthra* (GUIMARÃES et al., 2007)].

4. REFERÊNCIAS

- ANDRADE NETTO, J. F. **Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica**, 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- ARRUDA, F. O.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, jan-abr. 2004.
- BECKER, T. W.; CABOCHE, M.; CARRAYOL, E.; HIREL, B. Nucleotide-sequence of a tobacco c-DNA-encoding plastidic glutamine synthetase and light-inducibility organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. **Plant molecular biology**, Belgium, v. 19, n. 3, p. 367-379, 1992.
- BELTRÃO, N. E. de M.; SEVERINO, L. S.; SUINAGA, F. A.; VELOSO, J. F.; JUNQUEIRA, N.; FIDELIS, M.; GONÇALVES, N. P.; SATURNINO, H. M.; ROSCOE, R.; GAZZONI, D.; DUARTE, J. O.; DRUMOND, M. A.; ANJOS, J. B. **Recomendação técnica sobre o de pinhão-manso plantio no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. Folder. Disponível em: <<http://www.cpa0.embrapa.br/portal/noticias/Position%20Paper.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2007.
- BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: STI/CIT, 1985. 364p. (Documentos, 16).

CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I.; MAGALHÃES, A. C. Redução de nitrato e m plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de luz e de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 1, p. 1-9, 1990.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, L. I. Partitioning of nitrate reductase activity in *Coffea arabica* L. and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes. **Braz. J. Plant Physiol**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 397-406, 2006.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I. Distribuição da assimilação de nitrato e de matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 1, p. 29-37, 1991.

CORUZZI, G. M.; BUSH, D. R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, p. 61-64, 2001.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Boston: Houghyon Mifflin, 1981.1261 p.

CUNHA, P. C. da. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos de *Jatropha curcas* L. cultivada sob estresse salino**. 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em botânica) – Programa de pós graduação em botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

EDWARDS, J. W.; CORUZZI, G. M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. **The plant cell**, New York, v.1, n. 2, p. 241-248, 1989.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS- EPAMIG. Projeto pinhão-manso: relatório final relativo ao 1º período encerrado a 31 de março de 1985. In: EPAMIG **Coletâneas sobre pinhão-manso na EPAMIG**. Belo Horizonte: Belo Horizonte, 2005. Disponível em: <<http://www.epamig.br/informativo/pinhaomanso/.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. São Paulo: Planta, 2006. 401 p.

FARDEN, K. J. F.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzymes involved in metabolism involved nitrogenase. In: BERGENSEN, F. J. (Ed.). **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. New York: John Wiley, 1980. p. 265-314.

FERNANDES, M. S.; FERREIRA, M. B.; FREIRE, L. R. Efeitos da interação de N-NO_3^- e NH_4^+ na atividade da nitrato redutase e acumulação de N-protéico em *Brachiaria sp.* **Turrialba**, San José, v. 28, n. 3, p. 187-191, 1978.

FREITAS, R. B.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P., NASCIMENTO, M. N.; FRIES, D. D. Adubação do cafeeiro com nitrato de potássio via solo e folha, no outono-inverno e primavera-verão: efeitos na atividade da redutase no nitrato, no crescimento das plantas e na produção. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 31, n. 4, p. 945-952, jul./ago., 2007.

FREITAS, R. B.; OLIVEIRA, L. E. M.; DELÚ FILHO, N.; SOARES, A. M. Influência de diferentes níveis de sombreamento no comportamento fisiológico de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 804-810, jul./ago., 2003.

GUIMARÃES, M. M. C.; MATSUMOTO, S. N.; VIANA, A. E. S.; BONFIM, J. A.; SANTOS, M. A. F.; LIMA, J. M.; ARAUJO, G. de A.; CESAR, F. R. C. Avaliação do desenvolvimento de mudas de *Trema micranta* (L.) Blume sob diferentes níveis de sombreamento no município de Vitória da Conquista, BA. **Rev. Bras. de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 2, p. 1715-1718, out. 2007.

HAVLIN, J. L.; BEATON, J. D.; TISDALE, S. L.; NELSON, W. L. **Soil fertility and fertilizers – An introduction to nutrient management**. 7. ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. 515 p.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.** - Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. / International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 66 p.

HIREL, B. WEATHERLEY, C.; CRETIN, C.; BERGOUNIOUX, c.; GADAL, P. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. **Plant physiology**, Washington, v. 74, p. 4448-450, 1984.

JONGSCHAAP, R. E. E.; CORRE, W. J; BINDRABAN, P. S.; BRANDENBURG, W. A. **Claims and facts on *Jatropha curcas* L.** Wageningen: Plant Research International B.V., out. 2007, 66 p.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Pos-translation regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 363, n. 52, p. 1981-1989, 2001.

- KUMAR, G. P.; YADAV, S. K.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; JUWARKAR, A. A. Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* – a greenhouse study. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 2078-2082, 2008.
- LAM, H. M.; KOSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, New York, v. 47, p. 569-593, 1996.
- LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. dos S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-manso **R. Bras. Ci. Solo**, Viçosa-MG, v. 32, n. 1, p. 1969-1975, 2008.
- LEMONS, C. L., MATSUMOTO, S.N., COELHO, R.A., SANTOS, M. A.F., CESAR, F. R. C. F., BONFIM, J. A., GUIMARAES, M. M. C., LIMA, J. M., ARAUJO, G. S., SOUZA, A.J.de J. Os efeitos do sombreamento na atividade da redutase de nitrato em folhas de *Coffea arabica* L. **Rev. Bras. de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 2, p. 1070-1074, out. 2007.
- LIMA JUNIOR, E. C.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; BARBOSA, J. C. R. A. D. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2006.
- MARTINAZZO, E. G.; ANESE, S.; WANDSCHEER, A. C. D.; PARTORINI, L. H. Efeito do sombreamento sobre o crescimento inicial e teor de clorofila foliar de *Eugenia uniflora* Linn (Pitanga) – Família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 162-164, jul. 2007. Suplemento 2.
- MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação em sementes de pinhão-manso. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 863-868, maio/jun. 2008.
- McNALLY, S. F.; ORBANJO, T. O.; HIREL, B., STEWART, G. R. Glutamine synthetase isoenzymes of *Striga hermonthica* and other angiosperm root parasites. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 610-614, 1983.
- MEGURO, N. E.; MAGALHÃES, A. C. Water stress affecting nitrate reduction and leaf diffusive resistance in *Coffea arabica* L. cultivars. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 58, n. 1, p. 147-152, 1983.

MIFLIN, B. J.; WALLSGROVE, R. M.; LEA, P. J. Glutamine metabolism in higher plants. **Current topics cellular regulation**, Bethesda, v. 2, n. 1, p.1-43, 1981.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 282 p.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 3-28, 1995.

PUJAD-RENAUD, V.; CLEMENT, A.; PERROT-RECHENMANN, C. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. **Plant physiology**, Washington, v. 105, n. 1, p. 127-132, may, 1994.

REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do jequitibá-rosa. **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n. 53, p. 179-194, jul./dez. 2006.

ROBERT, F. M.; WONG, P. P. Isoenzymes of glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L. root nodules. **Plant physiology**, Washington, v. 81, n. 1, p. 142-148, 1986.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-mansô (*Jatrofa curcas* L.). **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SLUSZZ, T.; MACHADO, J. A. D. Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas. **Anais...** Porto Alegre: Fortaleza, 2006. Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022006000100032&lng=pt&nrm=abn>. Acesso em: 10 jun. 2010.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 98.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TJADEN, G.; EDWARDS, J. W.; CORUZZI, G. M. *Cis* elements and *trans*-acting factors affecting regulation of a non-photosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant physiology**, Washington, v. 108, n. 3, p. 1109-1117, 1995.

TONG, L.; SHU-MING, P.; WU-YUAN, D.; DAN-WEI, M.; YING, X.; MENG, X.; FANG, C. Characterization of a new stearyl-acyl carrier protein desaturase gene from *Jatropha curcas*. **Biotechnology Letters**, London, v. 28, n. 9, p. 657–662, 2006.

CAPÍTULO 1

ALOCAÇÃO DE FOTOASSIMILADOS EM PLANTAS JOVENS DE *Jatropha curcas* L. SOB NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E CONCENTRAÇÕES DE NITRATO

ALOCAÇÃO DE FOTOASSIMILADOS EM PLANTAS JOVENS DE *Jatropha curcas* L. SOB NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E CONCENTRAÇÕES DE NITRATO

1. RESUMO

Com o advento do Programa Brasileiro de Biodiesel e o surgimento de grande demanda por óleos vegetais, o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) foi divulgado como uma alternativa para fornecimento de matéria-prima. Porém, o incentivo ao seu plantio causa grande apreensão aos técnicos envolvidos com a pesquisa agrícola, pois é uma cultura sobre a qual o conhecimento técnico ainda é muito limitado. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de níveis de sombreamento e concentrações de nitrato sobre o crescimento inicial de *J. curcas*. Foram testados quatro níveis de sombreamento com 70%, 50% e 30% de cobertura, e um tratamento sem uso da tela, e quatro doses de nitrato, aplicadas via solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938), nas concentrações: 0, 15, 30 e 45 mM. O delineamento experimental adotado foi em esquema fatorial 4x4, com nove repetições. Durante quatro meses avaliou-se a altura, o diâmetro do coleto, número de folhas, comprimento do pecíolo, área foliar e ao final do período experimental, analisou-se as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e a porcentagem de água na parte aérea e radicular. Não houve interação entre os tratamentos efetuados. Os resultados obtidos sugerem que *J. curcas* é responsiva ao sombreamento, como características ecofisiológicas que se refletem em adaptações morfológicas de expansão da área foliar, alongamento do pecíolo e crescimento em altura buscando ambientes com maior luminosidade. Ambientes com sombreamento de 30% são extremamente eficazes no controle da temperatura foliar e retenção de água no substrato permitindo o melhor desenvolvimento das plantas, entretanto, níveis acima de 50% de sombreamento são prejudiciais ao crescimento inicial da espécie por provocarem intenso estiolamento e redução no número médio de folhas. A realização da adubação nitrogenada é de suma importância no desenvolvimento inicial das plântulas, sendo os primeiros sintomas visuais de deficiência apresentados logo no primeiro mês após a germinação. Concentrações de nitrato superiores a 30 mM são prejudiciais por causarem redução em todos os parâmetros de crescimento analisados.

Palavras chave: Produção de mudas. Pinhão-manso. Intensidade luminosa. Nitrogênio. Análise do crescimento.

PHOTOASSIMILATES ALLOCATION IN YOUNG PLANTS OF *Jatropha curcas* L. UNDER LEVELS OF SHADING AND NITRATE CONCENTRATIONS

2. ABSTRACT

With the advent of the Brazilian Biodiesel Program and the emergence of strong demand for vegetable oils, jatropha (*Jatropha curcas* L.) was issued as an alternative supply of raw material. However, the encouragement of its cultivation has serious concerns about the technicalities involved with agricultural research, because it's a culture about technical knowledge is still very limited. The objective of this study was to assess the influence of levels of shading and nitrate concentrations in the initial growth of *J. curcas*. We tested four levels of shading with 70%, 50% and 30% coverage, and a treatment without the use of the screen, and four nitrate concentrations, nutrient solution applied through Hoagland and Arnon (1938), in concentrations: 0, 15, 30 and 45mM. The experimental design was 4x4 factorial design with nine replicates. During four months we evaluated height, diameter, leaf number, petiole length, leaf area and the end of the experiment, we analyzed the fresh and dry shoot and root system and the percentage of water shoot and root. There was no interaction between the treatments performed. The results suggest that with respect to the initial growth *J. curcas* is responsive to the shading, with physiologic characteristics that are reflected in morphological adaptations of leaf area expansion, petiole elongation and higher height looking environments with higher brightness. Shade environments with 30% are extremely effective in controlling leaf temperature and retention substrate water enabling better plant growth, however, levels above 50% shading is detrimental to early growth of the species to cause intense shading and reduction in the number of leaves. The realization of the nitrogen is of paramount importance in the early development of seedlings, and the first visual symptoms of deficiency appear in the first month after germination. Nitrate concentrations exceeding 30 mM are harmful because they cause a reduction in all growth parameters analyzed.

Keywords: Seedling production. *Jatropha*. Light intensity. Nitrogen. Analysis of growth.

3. INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta pertencente à família Euphorbiaceae, com muitos atributos, múltiplos usos e considerável potencial, dentre os quais prevenção e controle de erosão do solo, recuperação do solo e como cerca viva, porém seu papel mais importante no contexto atual, e que tem se destacado no Brasil, refere-se à produção de óleo em grande quantidade e com qualidade, para fabricação de biocombustível, *J. curcas* apresenta uma grande vantagem em relação a outras culturas, pois, além de não ser uma cultura que compete por áreas de plantio alimentar, se adapta a variadas condições externas, como por exemplo, solos contaminados por metais pesados ou com alta salinidade, além de ser tolerante ao déficit hídrico (CORTESÃO, 1956).

O pinhão-manso leva de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que se estende por 40 anos, e produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare, o que reflete de forma positiva para o cultivo da espécie (CUNHA, 2009). Embora seja uma planta conhecida e cultivada na América desde tempos remotos, e disseminada por todas as áreas tropicais, ainda se encontra em processo de domesticação e somente nas últimas três décadas passou a ser estudada agronomicamente, o que causa apreensão aos pesquisadores e produtores, pois, o conhecimento técnico sobre a espécie é ainda muito limitado (SATURNINO et al., 2005).

O nitrogênio é um dos fatores mais limitantes para o crescimento das plantas, sendo que o metabolismo do nitrogênio é o segundo maior processo metabólico vegetal, sendo superado apenas pela fotossíntese. O metabolismo deste nutriente envolve complexos sistemas de absorção, assimilação e mobilização que nem sempre são compreendidos em todas as espécies. Trata-se do nutriente mais dispendioso e o altamente exigido em diversas culturas, sendo apontado como o nutriente exigido em maior quantidade no desenvolvimento inicial de *J. curcas* (LAVIOLA; DIAS, 2008).

O ambiente de luz em que a planta cresce é de fundamental importância, pois a adaptação das plantas a este ambiente depende do ajuste do seu aparelho fotossintético de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível (GUIMARÃES et al., 2007). Entre os diversos componentes do ambiente, a luz é primordial para o crescimento das plantas, não só por fornecer energia para a fotossíntese, mas também por fornecer sinais que regulam seu desenvolvimento por meio de receptores de luz sensíveis a diferentes intensidades, qualidade espectral e estado de polarização. Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade, aos quais uma espécie está adaptada, podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas

e de crescimento. O sombreamento artificial é um método utilizado no estudo das necessidades luminosas das diferentes espécies em condições de viveiro, pois isola e quantifica o efeito da intensidade luminosa e fornece às parcelas experimentais condições uniformes de iluminação, quando comparada aos estudos em condições naturais (REGO; POSSAMAI, 2006).

Tendo em vista os poucos estudos sobre o crescimento inicial da espécie o objetivo deste trabalho foi verificar a influência de níveis de sombreamento e de concentrações de nitrato sobre algumas características biométricas de crescimento vegetativo em plantas jovens de *J. curcas*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição dos tratamentos

O experimento foi desenvolvido na UNESP/Campus de Ilha Solteira, localizada a 20°43'09" de latitude sul e 51°33'79" de longitude oeste, com altitude em torno de 335 metros, em casa de vegetação, com temperatura máxima de 32°C controlada automaticamente.

Foram semeadas três sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em cada saco de polietileno, com capacidade para três litros de substrato, com areia lavada no dia 21 de junho de 2010. As sementes utilizadas foram colhidas em 19 de junho de 2010, na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da UNESP (FEPE), localizada no município de Selvíria – MS. Foram utilizadas sementes provenientes de frutos secos, os quais após colheita foram mantidos em estufa com circulação forçada de ar, a temperatura de 38°C por 24 horas, e logo após serem retiradas dos frutos, foram semeadas sem qualquer tratamento pré-germinativo diretamente em areia úmida. O experimento foi irrigado diariamente por aspersão automática, durante três minutos, às 8h e às 18h.

Quinze dias após a emergência, as plantas foram desbastadas com base na uniformidade de altura e número de folhas, deixando-se somente uma planta por saco plástico, constituindo a parcela experimental.

Os tratamentos constituíram-se por quatro níveis de sombreamento, proporcionados por meio de telas de poliolefinas com 70%, 50%, 30% de cobertura e um tratamento sem o uso da tela e por quatro concentrações de nitrato: 0; 15; 30 e 45mM (correspondente a 0; 37,2; 74,4 e 111,6 mg de NO_3^- a cada aplicação), totalizando 16 tratamentos (Figura 1). As doses de

nitrogênio foram aplicadas via solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938), duas vezes por semana, 40 mL por planta. Os tratamentos foram implantados após obtenção do estande de plantas necessário para o experimento (21 dias após a semeadura).

Figura 1- Visão geral de uma parcela experimental, logo após a implantação dos tratamentos.



(HIRAKI, 2010).

4.2 Descrição das variáveis avaliadas

As avaliações de crescimento plantas de *J. curcas* foram realizadas mensalmente, durante 120 dias após o início dos tratamentos (DAT), totalizando quatro períodos de análise (30, 60, 90 e 120 DAT), com nove repetições por tratamento, sendo as seguintes variáveis analisadas:

a) Altura da planta (cm)

Utilizou-se régua graduada com precisão de $\pm 0,5$ mm e as plantas foram medidas a partir do colo até a inserção da última folha.

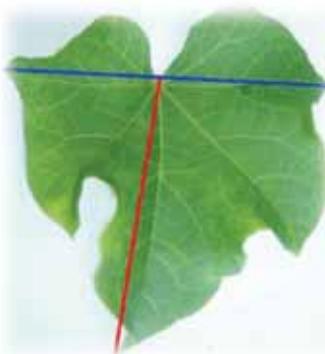
b) Diâmetro do coleto (mm)

Utilizando-se um paquímetro digital, as plantas foram medidas a 2 cm do substrato.

c) Área foliar (cm²)

A área foliar foi calculada pela fórmula $A = 0,84 (PxL) 0,99$. Onde: A= área foliar; P= comprimento da nervura principal e L= largura da folha (SEVERINO et al., 2007) (Figura 2).

Figura 2- Medidas lineares obtidas de folhas de pinhão-manso: nervura principal (P) representada pela linha vermelha e largura da folha (L), representada pela linha azul



(SEVERINO et al., 2007)

d) Número de folhas

Realizada através de contagem simples de todas as folhas completamente expandidas da planta.

e) Comprimento do pecíolo (cm)

Utilizou-se régua graduada com precisão de $\pm 0,5\text{mm}$, medindo-se sempre o pecíolo da primeira, segunda e terceira folhas verdadeiras, completamente expandidas de cada uma das unidades experimentais.

f) Comprimento da raiz principal (cm)

Ao final do período experimental utilizando-se régua graduada, com precisão de $\pm 0,5\text{mm}$, mediu-se o comprimento da raiz principal.

g) Massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular

Ao final do período experimental, utilizando-se balança com precisão de 0,01g, as seguintes medidas foram realizadas:

- **Massa fresca da parte aérea:** massa média, em gramas, da parte aérea (caule e folhas) das plantas escolhidas aleatoriamente, por tratamento.
- **Massa fresca das raízes:** massa média do sistema radicular das plantas escolhidas aleatoriamente, por tratamento.
- **Massa seca da parte aérea:** após pesagem da massa fresca, as partes aéreas das plantas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa de circulação de ar forçada a 65°C até a obtenção de peso constante, para a estimativa da massa média da matéria seca.
- **Massa seca das raízes:** após pesagem da massa fresca, os sistemas radiculares das plantas foram acondicionados em sacos de papel e levados à estufa de circulação de ar forçada a 65°C até a obtenção de peso constante, para a estimativa da massa média da matéria seca.

h) Porcentagem de água

Ao final do período experimental utilizando-se balança de precisão de 0,01g, aferiram-se as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, e pela diferença entre essas massas foi calculada a porcentagem de água retida nas duas partes das plantas.

4.3 Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do teste F e testes Tukey em nível de 5% de probabilidade e de regressão para variáveis contínuas, também em nível de 5%, seguindo a metodologia descrita por Gomes (2000), utilizando-se o programa de análises estatísticas SISVAR (FERREIRA, 2000). Para avaliar a relação existente entre os parâmetros analisados, realizou-se correlações lineares de Pearson, utilizando-se o programa BioEstat (AIRES, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo do tempo de permanência em casa de vegetação

As médias de altura, diâmetro do coleto, relação altura/diâmetro do coleto, número de folhas, comprimento do pecíolo e área foliar de *J. curcas*, obtidas durante os períodos de permanência em casa de vegetação, apresentaram diferenças pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 1).

A altura e o diâmetro do coleto apresentaram diferenças aos 30, 60, 90 e 120 DAT, com aumentos lineares nas médias gerais com o passar do tempo. Com relação ao número médio de folhas houve diferenças significativas entre os períodos de 30 e 90 DAT, sendo que nos períodos 60 e 120 DAT as médias foram estatisticamente iguais, pois entre 105 e 120 DAT ocorreu uma queda natural de folhas, fazendo com que a média geral no número de folhas diminuísse. A redução na média de comprimento do pecíolo deve-se também à queda das folhas no mesmo período, pois as folhas que eram inicialmente amostradas tiveram de ser substituídas por folhas mais jovens, com pecíolos menores refletindo na diminuição da média geral entre 90 e 120 DAT.

Tabela 1- Médias de altura, diâmetro do coleto, relação altura/ diâmetro do coleto (H/DC), número de folhas, comprimento do pecíolo (Pecíolo), área foliar, Teste F e diferença mínima significativa (DMS) em *J. curcas* obtidas nos quatro períodos de permanência em casa de vegetação após o início dos tratamentos (DAT).

Período (DAT)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	H/DC	n° de folhas	Pecíolo (cm)	Área foliar (cm ²)
30	14,42 d	12,43 d	1,17a	4,92 c	-	-
60	15,26 c	16,26 c	0,95 b	6,02 b	11,15 a	67,21 b
90	17,41 b	17,74 b	0,99 bc	8,68 a	11,49 a	66,77 b
120	20,56 a	19,83 a	1,04 b	5,99 b	10,45 b	79,38 a
Teste F	165,55**	535,14**	45,47**	154,77**	7,84**	4,13*
DMS	0,78	0,49	0,05	0,47	0,63	11,72

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$. Significativo pelo teste F $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, ns = não significativo.

Farias et al. (1997) relataram que em mudas de cedrorana (*Cedrelinga catenaeformis*) não ocorreram diferenças significativas na altura das mudas nos períodos de 60, 90 e 120 dias e que estes valores foram superiores ao observado nas mudas obtidas com 30 dias. Verificaram também que as mudas com 30 dias já haviam atingido o tamanho considerado ideal para o plantio no campo, que é de 25 a 30 cm para espécies arbóreas, sendo assim, a permanência das mudas no viveiro após 30 dias poderia resultar na perda da resistência ao dessecamento (endurecimento) e provocar maior sensibilidade nas mudas quando transplantadas, sendo necessário efetuar poda de raiz para o transporte ao campo. Para as mudas de *J. curcas* aqui analisadas, e nas condições experimentais efetuadas, a permanência em casa de vegetação até os 120 DAT (plantas com 141 dias após a sementeira) não resultou em danos para as plantas, uma vez que tanto para a altura como para o diâmetro do coleto, foi observado ganho em crescimento durante todo o período experimental, podendo dessa forma prolongar-se o tempo de permanência em casa de vegetação até que se alcance médias estáveis. Por outro lado, para que o aumento de permanência em casa de vegetação seja considerado válido, é necessário avaliar com mais precisão, em novos experimentos, o tamanho adequado do recipiente utilizado, o tipo de substrato e a adubação efetuada.

A área foliar não apresentou diferenças significativas entre 60 e 90 DAT, mas observou-se valores estatisticamente superiores aos 120 DAT, mesmo após a mudança da folha amostrada, devido à queda já relatada anteriormente. Farias et al. (1997) também relataram que em mudas de cedrorana aos 120 dias de permanência em viveiro, apresentaram médias de áreas foliar superiores aos períodos antecedentes.

A relação entre a altura e o diâmetro do coleto apresentou diferenças significativas em todos os períodos amostrados sendo que entre 60 e 90 DAT, e entre 90 e 120 DAT, os valores são estatisticamente iguais. Levando-se em consideração que uma muda com qualidade para ser levada a campo deve ter uma boa relação entre a altura e diâmetro do colo, para que apresente resistência a agentes externos como o vento, pode-se inferir com base nos resultados obtidos que as plantas com 60 DAT já apresentavam características propícias para serem levadas a campo uma vez que esta relação torna-se relativamente estável a partir deste período. Além disso, as plantas com 60 DAT já apresentavam bom desenvolvimento em altura, diâmetro do colo e número de folhas, entretanto, salienta-se que a manutenção das plantas por períodos mais longos nestas condições experimentais podem ser mantidas, sem prejuízos em termos de crescimento, por períodos superiores aos 120 DAT, os quais ainda devem ser definidos com maior precisão, em estudos posteriores, por um período mais longo de avaliação.

Nos quatro períodos avaliados, não se detectou interações significativas entre os níveis de sombreamento e as concentrações de nitrogênio testadas, sendo assim, os efeitos desses tratamentos foram analisados e discutidos separadamente.

5.2 Partição de fotoassimilados em função do sombreamento em *J. curcas*

Na Tabela 2 são apresentadas as médias de altura, diâmetro do coleto, relação altura/diâmetro do coleto, número médio de folhas, comprimento do pecíolo e área foliar, aos 30, 60, 90 e 120 DAT, em função dos níveis de sombreamento testados.

No primeiro período de tratamento (30 DAT) analisou-se somente a altura, o diâmetro do coleto, a relação altura/ diâmetro do coleto e o número de folhas, e somente a partir dos 60 DAT as demais variáveis foram analisadas.

Verificou-se diferenças em altura aos 30, 60 e 120 DAT, com ajustes lineares de regressão, conforme equações apresentadas na Tabela 2. Diferenças significativas no diâmetro do coleto foram observadas em todos os períodos analisados, sendo que somente aos 30 DAT ajustou-se ao modelo linear, decrescendo com o aumento dos níveis de sombreamento. Nos demais períodos analisados, o diâmetro do coleto obteve ajustes de regressão quadráticos, mantendo-se estável entre 30 e 50% de sombreamento e decrescendo após esse nível.

Através dos resultados obtidos observa-se que o crescimento de *J. curcas* é influenciado pelos diferentes níveis de sombreamento, dando preferência ao crescimento em altura em detrimento ao crescimento lateral, buscando maior captação de luz.

Tabela 2- Médias de altura, diâmetro do coleto (Diâmetro), número de folhas, comprimento do pecíolo (Pecíolo), área foliar (Área), relação altura/diâmetro do coleto (H/DC), Teste F, R² e equação de regressão, nos níveis de sombreamento testados (Sombr.), aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT), em *J. curcas*.

Sombr. (%)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	n° de folhas	Pecíolo (cm)	Área (cm ²)	H/DC
30 DAT						
0	13,9	12,73	4,75	-	-	1,1
30	13,53	12,55	4,91	-	-	1,08
50	14,6	12,5	5,03	-	-	1,17
70	15,65	11,94	5,00	-	-	1,31
Teste F	5,9**	4,75**	0,61 ^{ns}	-	-	11,75**
R ²	66,87	78,66	-	-	-	99,84
Equação	y=0,0255x+13,46	y=0,0102x+12,811	-	-	-	y=0,000086x ² -0,002959x+1,18
60 DAT						
0	14,79	16,2	6,97	8,17	49,07	0,92
30	14,93	16,73	5,97	9,94	65,38	0,9
50	15,17	16,55	5,61	12,33	85,98	0,92
70	16,14	15,55	5,53	14,17	105,89	1,04
Teste F	5,24**	4,28**	10,0**	66,05**	35,96**	11,40**
R ²	75,83	98,66	90,38	97,95	97,61	97,63
Equação	y=0,0178x+14,591	y=0,0007x ² +0,042x+16,186	y=0,021x+6,809	y=0,0874x+7,876	y=0,8171x+45,939	y=0,000072x ² -0,00349x+0,9268
90 DAT						
0	17,33	17,81	9,89	8,39	50,43	0,99
30	16,35	18,22	9,08	10,64	71,85	0,9
50	18,01	18,03	8,53	12,72	90,06	1,01
70	17,94	16,91	7,22	14,21	108,86	1,07
Teste F	2,76 ^{ns}	3,76*	11,48**	68,07**	41,81**	4,28**
R ²	-	97,8	94,47	99,57	99,5	86,49
Equação	-	y=0,0007x ² +0,0393x+17,79	y=0,0365x+10,1	y=0,0846x+8,3162	y=0,835x+48,985	y=0,000008x ² -0,004213x+0,9824
120 DAT						
0	18,71	19,55	6,00	6,51	55,43	0,97
30	19,39	20,06	6,14	8,85	67,54	0,97
50	21,5	20,43	5,33	11,49	94,7	1,05
70	22,65	19,26	6,47	14,95	99,83	1,18
Teste F	11,51**	2,4 ^{ns}	2,66 ^{ns}	57,23**	3,38*	12,27**
R ²	92,72	-	-	96,46	92,92	99,75
Equação	y=0,059x+18,35	-	-	y=0,11928x+5,978	y=0,689x+53,538	y=0,000076x ² -0,0237x+0,973

Significativo pelo teste F *p<0,05, **p<0,01, ns = não significativo.

O aumento no tamanho do diâmetro e a diminuição do crescimento em altura, em relação ao aumento da incidência luminosa, foram descritos por Rego e Possamai (2006) em trabalho com mudas de Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). Os autores relataram que maiores diâmetros do coleto sob maiores níveis de radiação, foram observados também em espécies como *Tabebuia avellanedae*, *Erythrina speciosa* e *Platygyamus regnelli*, sendo que o crescimento em diâmetro apresenta uma relação direta com a fotossíntese líquida, a qual depende dos carboidratos e auxinas acumulados e de um balanço favorável entre fotossíntese líquida e respiração. Segundo estes autores, o maior crescimento das mudas em altura, quando sombreadas, pode ter ocorrido em razão do estiolamento induzido pela baixa intensidade luminosa, ou porque foi favorecido pelas temperaturas mais amenas nas folhas, devido à abertura dos estômatos e a fixação de carbono pelas plantas. A redução do crescimento em altura em plantas não sombreadas está associada à elevação da temperatura das folhas e, conseqüentemente, à intensificação da taxa respiratória, o que induziria ao fechamento dos estômatos, reduzindo a fixação de carbono e causando um aumento no consumo de fotoassimilados. É provável que, sob sombreamento, tenha havido um eficiente controle da temperatura foliar e, conseqüentemente, do status hídrico da planta, de modo a permitir uma otimização da atividade fotossintética e da turgescência, necessárias ao crescimento.

As médias de área foliar e o comprimento do pecíolo aumentaram linearmente, em todos os períodos amostrados em função do aumento dos níveis de sombreamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Pedroso e Varela (1995) em estudo realizado com mudas de *Ceiba pentandra*; Silva et al. (2006) com mudas de maracujá (*Passiflora edulis*); por Rego e Possamai (2006) em mudas de Jequitibá-rosa; por Engel e Poggiani (1990) com mudas de *Erythrina speciosa* e por Portela et al. (2001) em mudas de Canafístula (*Clitoria fairchildiana*). O aumento na área foliar é explicado como uma forma da planta aumentar rapidamente a superfície fotossintetizante e assegurar um aproveitamento maior das baixas intensidades luminosas (ENGEL; POGGIANI, 1990; SILVA et al., 2006). Esta variação na área foliar, agregada às maiores médias em altura e comprimento do pecíolo, reforça ainda mais esta explicação, demonstrando que a espécie *J. curcas* possui mecanismos ecofisiológicos, que refletem-se em adaptações morfológicas para adaptação à baixa intensidade luminosa. Rego e Possamai (2006) também observaram que quanto menor o diâmetro do coleto das plantas jovens, maior é a altura, a área foliar e área específica foliar em jequitibá-rosa.

A adaptação às baixas luminosidades é, segundo Larcher (2000), uma característica genética, a qual faz com que as folhas apresentem estrutura anatômica e propriedades

fisiológicas que as capacitem ao uso efetivo da radiação solar disponível. Embora o crescimento das plantas tenha apresentado este comportamento de crescimento aumentado para as variáveis: altura, comprimento do pecíolo e área foliar, em função do aumento do sombreamento, em condições de cultivo protegido, o pinhão-manso é uma espécie que em condições naturais costuma crescer em terrenos abandonados e com pouca vegetação, isto é, áreas com alta intensidade luminosa, pois não é capaz de competir com uma vegetação densa (EPAMIG, 2005), sendo assim, é importante salientar que a imposição de condições sombreadas ao crescimento de *J. curcas* é interessante somente para a formação das mudas em viveiros, pois acelera o crescimento antes do transplante para o campo, sendo conveniente levar em consideração tanto a altura como o diâmetro do coleto, pois plantas altas e com caules finos apresentam uma tendência maior ao tombamento e quebra por agentes mecânicos como o vento.

O número médio de folhas não foi significativo aos 30 e 120 DAT, mas nos períodos compreendidos entre 60 e 90 DAT diminuiu linearmente com o aumento do sombreamento.

Comparando-se médias obtidas entre área foliar e número de folhas, é possível observar um aparente deslocamento de fotoassimilados em prol ao aumento da primeira variável em detrimento ao número de folhas nos tratamentos mais sombreados. A área foliar, que é maior em ambientes mais sombreados, indica o investimento da planta na maior superfície exposta para a interceptação dos raios luminosos, enquanto menores áreas foliares representam menor superfície exposta ao sol, o que torna a planta como um todo menos sujeita à transpiração e elevação da temperatura, sem comprometer a fotossíntese, uma vez que a luz é um recurso abundante (NIINEMETS; FLECK, 2002). Esses resultados são comprovados através da análise de correlação linear aos 90 DAT (Tabela 3), que apesar de ser considerada uma correlação fraca ($r=-0,1994$), o sinal negativo indica o comportamento inverso no deslocamento de fotoassimilados relatado. A mesma correlação negativa foi também observada para a relação existente entre número de folhas e comprimento do pecíolo, aos 90 DAT ($r= -0,2392$).

Tabela 3- Correlação entre altura, diâmetro do coleto, número de folhas, comprimento do pecíolo e área foliar, em plantas jovens de *J. curcas*, nos quatro períodos analisados.

	Altura	Diâmetro	n° de folhas	Pecíolo	Área
30 DAT					
Altura	1,000				
Diâmetro	0,1763*	1,000			
n° de folhas	0,4373**	0,3587**	1,000		
60 DAT					
Altura	1,000				
Diâmetro	0,3603**	1,000			
n° de folhas	0,3598**	0,3858**	1,000		
Pecíolo	0,4241**	0,0496 ^{ns}	-0,1749*	1,000	
Área	0,4599**	0,0824*	-0,1172 ^{ns}	0,9377**	1,000
90 DAT					
Altura	1,000				
Diâmetro	-0,0863 ^{ns}	1,000			
n° de folhas	0,5885**	-0,1662*	1,000		
Pecíolo	0,1793*	0,0476 ^{ns}	-0,2392**	1,000	
Área	0,2026*	0,0344 ^{ns}	-0,1994*	0,9564**	1,000
120 DAT					
Altura	1,000				
Diâmetro	0,4323**	1,000			
n° de folhas	0,4832**	0,2805**	1,000		
Pecíolo	0,5203**	0,2331**	0,2586**	1,000	
Área	0,2682**	0,2421**	0,189 ^{ns}	0,2000*	1,000

Significativo pelo teste F *p<0,05, **p<0,01, ns = não significativo.

Assim como ocorreu com a altura, o comprimento médio do pecíolo obteve as maiores médias com os níveis de sombreamento mais elevados (Figura 3). Espindola Junior et al. (2009) descreveram alongamento do pecíolo e aumento da área foliar em *Mikania glomerata* com o aumento do sombreamento, e consideraram que sendo uma das principais funções do pecíolo a sustentação e orientação da folha (NINEMETS; FLECK, 2002), sua organização anatômica e disposição de tecidos têm interação direta com o volume foliar que sustenta (PEARCY; YANG, 1998). Assim, os pecíolos das folhas do tratamento mais sombreado, que

possuem maior volume, representados pelo maior comprimento, diâmetro e espessura dos tecidos de sustentação, estão relacionados aos maiores valores médios de área e massa da lâmina, observados pelos autores. Os resultados obtidos neste trabalho aos 60 e 90 DAT com *J. curcas* (Tabela 3), tendo em vista às fortes correlações lineares positivas ($r=0,9377$ e $0,9564$, respectivamente) encontradas, corroboram as afirmações feitas por esses autores.

Figura 3- Aspecto geral de *Jatropha curcas* L. cultivada sob 70% de sombreamento (a) e sem sombreamento (b). Observar aumento na área foliar, alongamento do pecíolo (setas) e aumento do diâmetro do caule.



(HIRAKI, 2010).

Leeflang et al. (1998) consideram que o aumento de comprimento do pecíolo só ocorre com o incremento de biomassa deste, por meio de alterações dos tecidos mecânicos ou espessura, uma vez que este investimento é necessário para sustentação do peso da folha. Os mesmos autores ainda mencionaram que o crescimento do pecíolo é regulado por estímulos de luz que atingem a lâmina, o que mostra, segundo Niinemets e Fleck (2002), a importância

desta estrutura no posicionamento da folha para a captura de luz. Com base nos argumentos dos autores citados, pode-se concluir que a redução no número de folhas em *J. curcas* quando sombreadas deu-se devido ao deslocamento de fotoassimilados para outras estruturas de captação luminosa, neste caso o limbo foliar e o pecíolo que o sustenta.

Ao final do período experimental analisou-se as massas fresca e seca das plantas. Verificou-se diferenças significativas para a massa fresca da parte aérea (MFPA) que aumentou linearmente com o aumento nos níveis de sombreamento, enquanto a massa seca do sistema radicular (MSR) decresceu linearmente com o aumento do sombreamento. Para a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca do sistema radicular (MFR) não foram detectadas diferenças significativas. As porcentagens de água tiveram ajustes quadráticos de regressão mantendo-se estáveis entre 0 e 50% de sombreamento e aumentando ao nível de 70% tanto na parte aérea (H₂O PA) como no sistema radicular (H₂O R) (Tabela 4).

Tabela 4- Médias de massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca do sistema radicular (MFR), massa seca do sistema radicular (MSR), porcentagem de água na parte aérea (H₂O PA) e nas raízes (H₂O R), e comprimento da raiz principal (CR) em *Jatropha curcas* L., nos níveis de sombreamento testados (Sombr.), Teste F, R² e equações de regressão, ao final do período experimental.

Sombr. (%)	MFPA(g).....	MSPA	MFR	MSR	H ₂ O PA(%).....	H ₂ O R	CR (cm)
0	50,02	10,42	26,75	6,04	79,36	77,69	24,25
30	53,35	11,19	24,38	5,54	79,06	77,39	25,35
50	60,14	12,48	26,05	5,5	79,35	79,21	23,9
70	59,57	10,94	22,92	4,21	81,96	81,86	26,66
Teste F	4,1**	2,59 ^{ns}	1,99 ^{ns}	7,46**	27,24**	27,13**	5,98**
R ²	87,55	-	-	79,69	95,4	99,67	34,93
Equação	y=0,15 4x+49, 996	-	-	y=- 0,0234x+6, 1983	y=0,00142x ² - 0,065506x+79 ,4291	y=0,00163x ² - 0,05389x+7 7,6605	y=0,0246x +24,119

Significativo pelo teste F *p<0,05, **p<0,01, ns = não significativo.

O aumento da MFPA deve-se somente ao aumento na quantidade de água retida nos tecidos nos tratamentos mais sombreados, já que para a MSPA não foi obtido diferenças

significativas. Espindola Junior et al. (2009) também descreveram aumento no teor de água em folhas de *Mikania glomerata* com a diminuição da intensidade luminosa.

Rego e Possamai (2006), Silva et al. (2006) e Portela et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes para MSR, entretanto dão explicações diferentes para os resultados obtidos. Os primeiros acreditam que por ser a base do caule o local que experimenta o maior sombreamento proporcionado pelas folhas superiores, ocorre uma menor produção de fotoassimilados por parte das folhas inferiores, as quais são as responsáveis por atender a demanda de carbono nas raízes, fazendo com que a massa seja menor nas plantas com maior sombreamento. Já Silva et al. (2006) atribuem a maior quantidade de massa seca na raiz nas plantas sem cobertura à diminuição da quantidade de auxina que é careada para este órgão em plantas sombreadas, resultando em redução da formação de raízes laterais e, eventualmente, do crescimento da raiz principal. Analisando-se a variável comprimento da raiz principal (Tabela 4), nota-se que ocorreu um aumento linear no comprimento das raízes com os maiores índices de sombreamento, sendo assim, a hipótese descrita anteriormente por Silva et al. (2006) a respeito da diminuição do carreamento de auxina para o sistema radicular não é cabível já que houve aumento no comprimento das raízes em função do aumento no sombreamento.

Pegoraro et al. (2010) em estudo com *Mentha x piperita* L. obteve resultados semelhantes para MSR e área foliar, para estes autores, o aumento de intensidade luminosa geralmente causa um aumento do consumo de água, mas as plantas apresentaram capacidade de ajustar-se a esta situação, aumentando a proporção de biomassa entre raiz e parte aérea, o que favorece a captação de água e nutrientes e aumentando a relação entre massa e área foliar, o que contribui para diminuição da transpiração.

Os ajustes das características morfológicas em função da variação de intensidade luminosa mostram a plasticidade da espécie em estudo, do ponto de vista ecológico. No entanto, para o produtor, o desempenho da espécie em cada tratamento deve ser definido com base em uma visão geral da altura, diâmetro do coleto e número de folhas, o que reflete na adoção de técnicas de manejo e ganhos de produtividade. Assim, seria prudente adotar níveis de sombreamentos até 30%, sendo que 50% seria o limite de restrição luminosa para o crescimento de *J. curcas* com qualidade e razão altura/diâmetro do coleto adequados para transplantes. Entretanto, estudos referentes às taxas de crescimento da planta, respostas sazonais, condições nutricionais diferenciadas e tempo em viveiros e/ou casa de vegetação antes do plantio definitivo podem complementar as informações para adoção de métodos de cultivo mais eficientes.

5.3 Partição de fotoassimilados em função das concentrações de nitrato aplicadas em *J. curcas*.

As médias de altura, diâmetro do coleto, número médio de folhas por planta, comprimento do pecíolo, área foliar e relação altura/diâmetro do coleto, bem como as equações de regressão em função das concentrações de nitrogênio aplicadas são apresentadas na Tabela 5.

A altura e o diâmetro do coleto de *J. curcas* apresentaram diferenças em todos os períodos analisados com ajustes de regressão quadráticos (Tabela 5). As alturas máximas, de acordo com as respectivas equações de regressão, foram obtidas nas concentrações 25,85mM, 29,65mM, 31,92 mM e 35,53mM aos 30, 60, 90 e 120 DAT, respectivamente, e os maiores diâmetros de coleto foram obtidos em 36,56mM, 27,42mM, 26,72mM e 25,28mM. Verifica-se, portanto, com base nos pontos de máximo obtidos pelas equações de regressão, que no início do crescimento as maiores necessidades em nitrogênio são requeridas pelo crescimento lateral, e que depois essa necessidade vai diminuindo, passando a requerer maior quantidade de nitrogênio para o desenvolvimento em altura.

A altura e o diâmetro de coleto fornecem uma excelente estimativa da predição do crescimento inicial e sobrevivência no campo, sendo tecnicamente aceitos como boas medidas do potencial de desempenho das mudas, apesar de serem parâmetros que podem ser influenciados por algumas práticas que são adotadas nos viveiros florestais (MEXAL; LANDS 1990, citados por CRUZ et al., 2006). Tratam-se de parâmetros de fácil determinação, não são métodos destrutivos, além das medições serem muito simples (GOMES et al., 2002, citados por CRUZ et al., 2006). Com base na análise de correlação linear (Tabela 6), verifica-se que todas as correlações entre a altura e os diferentes tipos de massa analisados, à exceção da massa seca da raiz (MSR) obtiveram correlações moderadamente positivas, variando entre 0,5365 à 0,7899 podendo assim ser considerada um bom parâmetro para a avaliação não destrutiva das plantas.

Tabela 5- Médias de altura, diâmetro, número de folhas, comprimento do pecíolo (Pecíolo), área foliar (Área), relação altura/diâmetro do coleto (H/DC), Teste F, R² e equação de regressão, em função das concentrações de nitrato aplicadas (Concen.), aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT), em *Jatropha curcas* L.

Concen. (mM)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	n° de folhas	Pecíolo (cm)	Área (cm ²)	H/DC
30 DAT						
0	13,49	11,72	4,17	-	-	1,16
15	14,92	12,49	5,22	-	-	1,19
30	14,94	12,73	5,11	-	-	1,18
45	14,33	12,79	5,19	-	-	1,13
Teste F	3,16*	9,81**	9,98**	-	-	0,85 ^{ns}
R ²	97,92	99,04	87,98	-	-	-
Equação	y=- 0,0023x ² +0, 119x+13,53	y=- 0,0008x ² +0,058 5x+11,738	y=- 0,0011x ² +0,068 2x+4,2375	-	-	-
60 DAT						
0	13,71	14,89	4,69	10,82	71,71	0,93
15	15,92	17,01	6,75	11,57	80,09	0,94
30	15,83	16,79	6,39	11,53	80,1	0,95
45	15,57	16,34	6,25	10,69	74,41	0,97
Teste F	15,40**	14,26**	18,81**	2,01 ^{ns}	1,05 ^{ns}	0,80 ^{ns}
R ²	93,17	91,74	85,95	-	-	-
Equação	y=- 0,0027x ² +0, 160x+13,82	y=- 0,003x ² +0,1645 x+14,936	y=- 0,0024x ² +0,138 8x+4,822	-	-	-
90 DAT						
0	14,36	15,94	7,19	10,69	69,47	0,91
15	18,21	18,93	9,25	11,94	84,92	0,97
30	18,64	18,31	9,25	11,86	85,66	1,03
45	18,43	17,79	9,03	11,46	81,14	1,05
Teste F	19,28**	18,63**	9,06**	3,46*	3,76*	3,64*
R ²	96,91	86,3	94,36	94,75	97,35	96,59
Equação	y=- 0,0045x ² +0, 287x+14,59	y=- 0,0039x ² +0,20 84x+16,126	y=- 0,0025x ² +0,15 08x+7,282	y=- 0,0018x ² +0,09 74x+10,741	y=- 0,0222x ² +1,23 68x+69,43	y=0,00325x +0,91811
120 DAT						
0	16,61	17,64	5,72	9,36	53,21	0,94
15	21,06	21,31	6,53	12,36	82,54	0,99
30	22,02	20,84	6,08	10,69	107,48	1,07
45	22,36	19,51	5,61	9,39	74,28	1,16
Teste F	24,99**	23,89**	1,99 ^{ns}	8,74**	3,74*	10,99**
R ²	98,84	93,38	-	79,02	90,43	98,79
Equação	y=- 0,0046x ² +0, 327x+16,75	y=- 0,0056x ² +0,28 43x+17,804	-	y=- 0,0048x ² +0,20 45x+9,612	y=- 0,0515x ² +3,22 97x+51,33	y=0,004759 x+0,934861

Significativo pelo teste F *p<0,05, **p<0,01, ns = não significativo.

Tabela 6– Correlações entre altura, diâmetro do coleto, nº de folhas, comprimento do pecíolo, área foliar, comprimento da raiz principal (Raiz), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) e massa seca total, em plantas jovens de *J. curcas* ao final do período experimental.

	Altura	Diâmetro	Nº de folhas	Pecíolo	Área	Raiz	MFPA	MFR	MSPA	MSR	MST
Altura	1,000										
Diâmetro	0,4323**	1,000									
nº de folhas	0,4832**	0,2805**	1,000								
Pecíolo	0,5203**	0,2331**	0,2586**	1,000							
Área	0,2682**	0,2421**	0,1089 ^{ns}	0,2000*	1,000						
Raiz	0,1653*	0,1204 ^{ns}	0,0925 ^{ns}	0,2694**	0,0141 ^{ns}	1,000					
MFPA	0,7899**	0,8047**	0,5136**	0,5209**	0,2934**	0,2013*	1,000				
MFR	0,5365**	0,7805**	0,4806**	0,2137*	0,1279 ^{ns}	0,1063 ^{ns}	0,8238**	1,000			
MSPA	0,6641**	0,8292**	0,4524**	0,4145**	0,2646**	0,1462 ^{ns}	0,9565**	0,8521**	1,000		
MSR	0,4066**	0,7324**	0,4874**	0,0696 ^{ns}	0,0719 ^{ns}	-0,0210 ^{ns}	0,7194**	0,9168**	0,7925**	1,000	
MST	0,6052**	0,8362**	0,4876**	0,3119**	0,2089*	0,0937 ^{ns}	0,9196**	0,9180**	0,9759**	0,9065**	1,000

Significativo pelo teste F *p<0,05, **p<0,01, ns = não significativo.

As correlações obtidas entre o diâmetro do coleto e as diferentes massas analisadas mostraram-se ainda mais interessantes, variando entre 0,7324 e 0,8362 (Tabela 6), valores estes que segundo a escala de Pearson são considerados entre moderada à fortemente positivos. Demonstrando dessa forma a importância e eficácia deste método não destrutivo na análise do crescimento de *J. curcas*.

Apesar da altura ser um excelente parâmetro para avaliar o padrão de qualidade das plantas jovens, alguns trabalhos apontaram resultados contraditórios, como o de Barros et al. (1978), em que os autores constataram que, em mudas de *Eucalyptus grandis* com as maiores alturas, ocorreram menores taxas de crescimento e de sobrevivência após o plantio.

Os resultados obtidos para a relação altura/diâmetro do coleto (H/DC) foram significativos aos 90 e 120 DAT, com ajustes de regressão lineares em função das concentrações aplicadas (Tabela 05). Segundo Carneiro (1995), o valor resultante da divisão da altura da parte aérea de uma planta pelo respectivo diâmetro do coleto exprime um equilíbrio de crescimento, relacionando esses dois importantes parâmetros morfológicos num só índice e quanto menor for esse valor, maior será a capacidade das mudas em sobreviver e estabelecer-se. Para *J. curcas* seriam necessários mais estudos, com outros períodos de avaliação, para se delimitar os melhores valores para esta relação. Possivelmente, nesse estudo o maior crescimento em altura das mudas, elevando-se o valor da relação, ocorreu em consequência da adubação nitrogenada que favoreceu o crescimento vegetativo, impossibilitando encontrar um ponto estável para esta relação. Segundo Sturion e Antunes (2000), a relação altura da parte aérea/diâmetro do coleto constitui uma das características usadas para avaliar a qualidade de mudas florestais, pois, além de refletir o acúmulo de reservas, assegura maior resistência e melhor fixação no solo. Para Moreira e Moreira (1996), essa variável é reconhecida como um dos melhores, senão o melhor indicador do padrão de qualidade de mudas, sendo, em geral, o mais indicado para determinar a capacidade de sobrevivência de mudas no campo.

O número médio de folhas apresentou diferenças significativas com ajustes de regressão quadráticos em todos os períodos analisados com exceção aos 120 DAT onde não se detectou diferenças, provavelmente devido à queda acentuada de folhas ocorrida entre 90 e 120 DAT. De acordo com as equações obtidas, as maiores médias de números de folhas deram-se nas concentrações 31mM, 28,92mM e 30,16mM, aos 30, 60 e 90 DAT, respectivamente.

As variáveis: comprimento do pecíolo e área foliar apresentaram diferenças significativas a partir dos 90 DAT (Tabela 5). Apesar de não serem detectadas diferenças para estas variáveis aos

30 e 60 DAT, nota-se que na ausência de nitrato, ou seja, na ausência total de nitrogênio em solução nutritiva, em todos os períodos avaliados, todas variáveis analisadas apresentaram, sempre, menores médias, que na presença do nutriente, independentemente da concentração aplicada. Esses resultados demonstram a essencialidade do nitrogênio na fase inicial de crescimento de *J. curcas*. A adição de 15 mM de nitrato à solução nutritiva promoveu maiores crescimentos que quando ausente na solução nutritiva, em todas as variáveis analisadas, refletindo o fato de que o nitrogênio é um elemento que está ligado a todas as rotas metabólicas, de forma direta ou indireta, promovendo maior atividade fotossintética e, por conseguinte, maior acúmulo de biomassa (TAIZ; ZEIGER, 2009).

De modo semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, Cruz et al. (2006), Silva e Muniz (1995) citados por Cruz et al. (2006), notaram em seu estudo com mudas de *Cedrela fissilis*, cultivadas em solução nutritiva por 110 dias, que a ausência de nitrogênio na solução foi um dos elementos que mais influenciou negativamente o crescimento das plantas.

Uma vez conhecido o fato de que o nitrogênio está envolvido em todas as atividades metabólicas da planta, é natural observar maior crescimento à medida que aumenta a quantidade de nitrogênio aplicada à planta. É prudente, entretanto, considerar que existe nível ótimo a partir do qual a planta exhibe resultados indesejáveis à esse aumento, podendo regredir ou morrer (TAIZ; ZEIGER, 2009). Segundo os resultados obtidos neste estudo, a concentração máxima de nitrato a ser aplicada em *J. curcas* é de 30mM, e concentrações maiores podem acarretar em danos para a planta, como a diminuição das taxas de crescimento descritas neste trabalho.

Verifica-se que houve aumento de todas as variáveis analisadas até um ponto ótimo, por meio da aplicação de nitrato. Entretanto, altas concentrações acima de 30 mM proporcionaram efeitos depressivos em *J. curcas*. Resultados semelhantes também foram observados por Mendonça et al. (2006) em mamoeiro (*Carica papaya*), que também citaram comportamentos semelhantes no trabalho de Carvalho e Souza (1996) com utilização de elevadas dosagens de nitrogênio no crescimento de limoeiro Cravo e da tangerineira Cleópatra em bandejas. A assimilação de nitrato requer energia e esqueletos de carbono que, em órgãos heterotróficos como as raízes é fornecida pela oxidação dos carboidratos translocados da parte aérea. O nitrato é um poderoso competidor pela energia disponível nas raízes, de tal forma que, em plantas cultivadas em alto nível de nitrato, o teor de açúcares e o crescimento do sistema radicular são bem inferiores aos daqueles crescidos em baixo teor de nitrato, ou outras formas de nitrogênio (SCHRADER; THOMAS, 1981, citado por CARELLI; FAHL, 1991).

As massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e as porcentagens de água na parte aérea e no sistema radicular, aos 120 DAT, tiveram resultados significativos, para as concentrações de nitrato testadas, obtendo, para todas as variáveis, ajustes quadráticos de regressão (Tabela 7). Para o comprimento da raiz principal não foi verificada diferenças, contrastando com os resultados obtidos por Mendonça et al. (2006) que verificaram que as doses de nitrogênio, em mudas de mamoeiro, influenciaram o crescimento da raiz principal, com ajustes quadráticos de regressão.

Tabela 7- Médias de massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca do sistema radicular (MFR), massa seca do sistema radicular (MSR), porcentagem de água na parte aérea (H₂O PA) e nas raízes (H₂O R), e comprimento da raiz principal (CR) em *Jatropha curcas* L., nas concentrações de nitrato aplicadas, Teste F, R² e equações de regressão, ao final do período experimental.

Concen. (mM)	MFPA	MSPA	MFR	MSR	H ₂ O PA	H ₂ O R	CR
	(g)				(%)		(cm)
0	38,24	7,66	19,84	3,9	79,95	80,43	24,71
15	65,01	13,84	28,37	6,58	78,74	76,93	25,22
30	63,49	12,66	27,77	5,9	80,1	78,84	25,69
45	56,33	10,86	24,12	4,91	80,93	79,97	24,54
Teste F	25,61**	24,37**	10,47**	16,61**	12,0**	15,77**	1,05 ^{ns}
R ²	94,33	89,6	96	88,62	80,22	73,68	-
Equação	y=- 0,0377x ² + 2,0482x+3 9,373	y=- 0,0089x ² + 0,4551x+7 ,997	y=- 0,0135x ² +0 ,6906x+20, 144	y=- 0,0041x ² + 0,1992x+4, 0525	y=0,002256 x ² - 0,072762x+ 79,7898	y=0,00514 x ² - 0,227765x +80,1154	-

Significativo pelo teste F *p<0,05, **p<0,01, ns = não significativo.

De acordo com as equações de regressão obtidas, os pontos de máximo ganho em gramas para a massa fresca da parte aérea (MFPA), a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa fresca do sistema radicular (MFR) e a massa seca do sistema radicular (MSR) foram obtidas nas concentrações 27,16 mM, 25,58 mM para MSPA e MFR e 24,29mM, respectivamente.

De forma geral, a produção de matéria seca das raízes acompanhou o padrão com ajuste quadrático observado para a parte aérea, comportamento este que se se assemelha ao

relatado por Mattos Júnior et al. (2001), citados por Scivittaro et al. (2004), segundo os quais, sob concentrações mais altas de nitrogênio, o crescimento da parte aérea é maior que o das raízes. Com relação às médias de massas frescas, a massa da parte aérea foi 44,88% maior que a massa do sistema radicular, enquanto que entre as médias de massa seca, a parte aérea foi em média 47,25% superior em relação ao sistema radicular.

Corroborando os resultados obtidos por Cruz et al. (2006) em mudas de *Samanea inopinata*, observou-se que em *J. curcas* o sistema radicular, bem como a parte aérea das plantas foi afetado pela omissão de nitrogênio. Comparando-se o tratamento sem o nutriente, com a concentração 30 mM, ocorreu um ganho aproximado de 60% para as massas fresca e seca da parte aérea, e ganhos próximos a 70% nas massas fresca e seca do sistema radicular. Para confirmar ainda mais que os ganhos em massa devem-se a deposição em esqueletos carbônicos, verifica-se as porcentagens de água tanto na parte aérea como na raiz apresentaram um ajuste ao modelo quadrático de regressão revelando médias maiores nos dois extremos de tratamentos efetuados (0 e 45 mM) e uma ligeira queda nas concentrações intermediárias (15 e 30mM), justamente os tratamentos nos quais ocorreram as maiores médias nas análises das massas.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento inicial de *J. curcas* é influenciado pelos níveis de sombreamento apresentando mecanismos ecológicos de adaptação à condições de baixa luminosidade, como maior desenvolvimento em altura, aumento da área foliar e do pecíolo que a sustenta, em detrimento ao crescimento lateral e comprimento da raiz principal.

Níveis de sombreamento acima de 50% são prejudiciais ao crescimento de *J. curcas* por provocarem intenso estiolamento nas plantas e redução no número médio de folhas.

As concentrações de nitrato influenciam positivamente no crescimento inicial de *J. curcas*, sendo a concentração máxima para aplicação deve ser de até 30mM, por suprir todas as necessidades das plantas até os 120 dias.

7. REFERÊNCIAS

- AYRES, M.; AYRES, JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 5. ed. Belém: Universidade Federal do Pará, 2007. 339 p.
- BARROS, N. F.; BRANDI, R. M.; COUTO, L.; REZENDE, G. C. Efeitos de recipientes na sobrevivência e no crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* no viveiro e no campo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 2, n. 2, p. 141-151, 1978.
- CARELLI, M. L. C., FAHL, L. I. Partitioning of nitrate reductase activity in *Coffea arabica* L. and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes. **Braz. J. Plant Physiol**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 397- 406, 2006.
- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995. 451p.
- CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 231 p.
- CRUZ, C. A. F.; PAIVA, H. N.; GUERRERO, C. R. A. Efeito da adubação nitrogenada na produção de mudas de sete-cascas (*Samanea inopinata* (Harms) Ducke). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 4, p. 537-546, 2006.
- CUNHA, P. C. da. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos de *Jatropha curcas* L. cultivada sob estresse salino**. 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em botânica) - Programa de pós-graduação em botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.
- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Rev. Brasil. de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1990.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG. Projeto pinhão-manso: relatório final relativo ao 1º período encerrado a 31 de março de 1985. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG. **Coletâneas sobre pinhão-manso na EPAMIG**. Belo Horizonte: Belo Horizonte, 2005. Disponível em: <<http://www.epamig.br/informativo/pinhaomanso/.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2008.
- ESPINDOLA JUNIOR, A.; BOEGER, M. R. T.; MACCARI JÚNIOR, A.; REISSMANN, C. B.; RICKLI, F. L. Variação na estrutura foliar de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae)

sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasil. Bot.** São Paulo, v. 32, n. 4, p. 749-758, 2009.

FARIAS, V. C. C.; VARELA, V. P.; COSTA, S. S.; BATALHA, L. F. P. Análise de crescimento de mudas de cedrorana (*Cedrelinga catenaeformis* (Ducke) Ducke) cultivadas em condições de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 19, n. 2, p. 192-199, 1997.

FERREIRA, D. F. **Software sisvar versão 5.3**. Lavras: DEX/UFLA, 2000. 192 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California Agricultural Experimental Station, 1938. 39p.

KUMAR, G. P.; YADAV, S. K.; THAWALE, P. R.; SINGH, S.K.; JUWARKAR, A. A. Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* – A greenhouse study. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. ..., p. 2078–2082, 2008.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima artes e textos, 2000. 531p.

LEEFLANG, L.; DURING, H.K.; WERGER, M. J. A. The role of petioles in light acquisition by *Hydrocotyle vulgaris* L. in vertical light gradient. **Oecologia**, Heidelberg, v. 117, n. 1, p. 235- 238, 1998.

MENDONÇA, V.; PEDROSA, C.; FELDBERG, N. P.; ABREU, N. A. A.; BRITO, A. P. F. B.; RAMOS, J. D. Doses de nitrogênio e superfosfato simples no crescimento de mudas de mamoeiro ‘formosa’. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1065-1070, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; MOREIRA, F. W. Característica de germinação de 64 espécies de leguminosas florestais nativas da Amazônia, em condições de viveiro. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 26, n. 2, p. 3-16, 1996.

NIINEMETS, U.; FLECK, S. Petiole mechanics, leaf inclination, morphology, and investment in support in relation to light availability in the canopy of *Liriodendron tulipifera*. **Oecologia**, Heidelberg, v. 132, n. 1, p. 21-33, 2002.

PEARCY, R. W.; YANG, W. The functional morphology of light capture and carbon gain in the Redwood forest understorey plant *Adenocaulon bicolor* Hook. **Functional Ecology**, London, v. 12, n. 4, p. 543-552, 1998.

PEDROSO, S. G.; VARELA, V. P. Efeitos do sombreamento no crescimento de mudas de Sumauma (*Ceiba pentandra* (E.) Gaertn). **Revista brasileira de sementes**. Londrina, v. 17, n. 1, p. 47-51, 1995.

PEGORARO, R. L.; FALKENBERG, M. B.; VOLTOLINI, C. H.; SANTOS, M.; PAULINO, M. T. S. Produção de óleos essenciais em plantas de *Mentha x piperita* L. var. piperita (Lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição do substrato. **Revista Brasil. Bot.**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 631-637, 2010.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: USP, 2000. 477 p.

PORTELA, R. C. Q.; SILVA, I. L.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M. Crescimento inicial de mudas de *Clitoria fairchildiana* Howard e *Peltophorum dubium* (Spreng) Taub. em diferentes condições de sombreamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 163-170, 2001.

REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do jequitibá-rosa. **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n. 53, p. 179-194, 2006.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SCIVITTARO, W. B.; OLIVEIRA, R. P.; MORALES, C. F. G.; RADMANN, E. B. Adubação nitrogenada na formação de porta-enxertos de Limoeiro 'cravo' em tubetes. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 131-135, 2004.

SEVERINO, L. S.; VALE, L. S.; BELTRÃO, N. E. M. A simple method for measurement of *Jatropha curcas* leaf area. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2007.

SILVA, M. L. S.; VIANA, A. E. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; AMARAL, C. L. F.; MATSUMOTO, N.; PELACANI, C. R. Desenvolvimento de mudas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 513-521, 2006.

SLUSZZ, T.; MACHADO, J. A. D. Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas. **Anais...** Porto Alegre: Fortaleza, 2006. Disponível em:

<http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022006000100032&lng=pt&nrm=abn>. Acesso em: 10 jun. 2010.

STURION, J. A.; ANTUNES, B. M. A. Produção de mudas de espécies florestais. In: GALVÃO, A. P. M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**. EMBRAPA: Colombo, 2000. p. 125-150,

TONG, L.; SHU-MING, P.; WU-YUAN, D.; DAN-WEI, M.; YING, X.; MENG, X.; FANG, C. Characterization of a new stearyl-acyl carrier protein desaturase gene from *Jatropha curcas*. **Biotechnology Letters**, London, v. 28, n. 9, p. 657–662, 2006.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE DAS ENZIMAS REDUTASE DO
NITRATO E GLUTAMINA SINTETASE EM
PLANTAS JOVENS DE *Jatropha curcas* L. SOB
NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E
CONCENTRAÇÕES DE NITRATO

ATIVIDADE DAS ENZIMAS REDUTASE DO NITRATO E GLUTAMINA SINTETASE EM PLANTAS JOVENS DE *Jatropha curcas* L. SOB NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E CONCENTRAÇÕES DE NITRATO

1. RESUMO

O pinhão-mansão *Jatropha curcas* L. é considerado uma excelente opção agrícola para diversas regiões brasileiras, principalmente por ser uma espécie originária do continente americano, e com forte resistência à seca e altas temperaturas. Atualmente, essa espécie está sendo estudada com maior afinco para exploração comercial no Brasil, pois se trata de uma planta oleaginosa viável para a obtenção do biodiesel. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência das concentrações de nitrato e níveis de sombreamento, sobre as atividades das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em plantas jovens de *J. curcas*. Os tratamentos constituíram-se por quatro concentrações de nitrato, aplicadas via solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938), e quatro níveis de sombreamento (0, 30, 50 e 70%). Os resultados obtidos demonstraram que as atividades das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase, bem como o teor de proteína total solúvel diminuem linearmente com aumento do sombreamento, demonstrando a importância de altos índices de irradiância luminosa para o bom funcionamento deste metabolismo. O nitrogênio é um nutriente essencial para desenvolvimento inicial da espécie e concentrações de nitrato acima de 30mM são prejudiciais à atividade das duas enzimas analisadas, nos tecidos foliar e radicular. As folhas são os principais sítios de redução do nitrato e produção da glutamina em *J. curcas*.

Palavras chave: Pinhão-mansão. Sombreamento. Metabolismo do nitrogênio. Proteína solúvel.

NITRATE REDUCTASE AND GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITY IN YOUNG PLANTS OF *Jatropha curcas* L. UNDER LEVELS OF SHADE AND NITRATE CONCENTRATIONS

2. ABSTRACT

Jatropha curcas L. is considered an excellent option for many agricultural regions of Brazil, mainly because it is a demanding species with strong sunlight and drought resistance. Currently, this species is being studied more diligently to their commercial use in Brazil, because it is an oleaginous plant viable for obtaining biodiesel. The objective of this study was to assess the influence of different nitrate concentrations and levels of shading on the activities of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in young plants of *J. curcas*. The treatments consisted of four concentrations of nitrate, applied via the nutrient solution Hoagland and Arnon (1938), and four levels of shading (0, 30, 50 and 70% shading). The results showed that the activities of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase, and the total soluble protein content decreased linearly with increased shading. Nitrogen is a nutrient essential for the metabolism of the species and the initial nitrate concentrations exceeding 30mm are detrimental to the activity of two enzymes analyzed, in the leaves and roots tissues. The leaves are the main sites of nitrate reduction and production of glutamine in *J. curcas*.

Keywords: *Jatropha*. Shading. Nitrogen metabolism. Soluble protein.

3. INTRODUÇÃO

Somente nos últimos 30 anos, após a crise do petróleo, na década de 70, estudos com combustíveis alternativos aos derivados do petróleo foram intensificados, iniciando estudos agronômicos em todo o mundo por novas culturas bioenergéticas. Devido à dimensão continental do nosso país, e da sua diversidade de clima e de solos, estima-se que se existam aqui mais de 200 espécies de oleaginosas com potencial para produzir óleo para ser fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel (energia). Recentemente, surgiu o interesse pelo pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), que tem a vantagem de ser perene, possivelmente nativo do Brasil, e com sementes que apresentam óleo em grande quantidade e de boa qualidade para a produção sustentável de biodiesel, entretanto trata-se de uma espécie não-domesticada, e sobre a qual o conhecimento técnico básico e aplicado, ainda tem de ser ampliado.

No mundo todo, existem mais de 170 espécies pertencentes ao gênero *Jatropha*, sendo a espécie mais importante, sob o aspecto agronômico a *J. curcas*. Por se tratar de planta originária do continente sulamericano, a extração de óleo da semente do pinhão-manso surgiu como boa alternativa de cultura em regiões como o Nordeste e o Cerrado (PEIXOTO, 1973), pois, é resistente a condições edafoclimáticas desfavoráveis, como seca e solos salinos, o que indica possibilidade de utilização em áreas marginais, sem competição por área de culturas alimentícias (HELLER, 1996), além disso, devido à ausência de mecanização para a colheita, a atividade familiar e as pequenas propriedades são beneficiadas, ao cultivo da espécie.

O nitrogênio é o nutriente exigido em maior quantidade pela maioria das culturas e é importante por ser constituinte de moléculas de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e citocromos, além de ser constituinte da molécula de clorofila. A redutase do nitrato é a enzima responsável pela redução do nitrato a nitrito permitindo a posterior assimilação e fixação do nitrogênio nas plantas superiores. Sua atividade depende principalmente da presença do substrato (nitrato) bem como da luz, entre outros fatores como, a presença de gás carbônico, água e também o fator genético. A glutamina sintetase também é uma das enzimas de grande importância no metabolismo do nitrogênio devido à conversão do íon amônio, que é tóxico às células, em glutamina, fixando o N em aminoácidos. O funcionamento deste metabolismo em *J. curcas* é ainda pouco conhecido e este trabalho teve por finalidade analisar as atividades das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em folhas e raízes de plantas jovens de *J. curcas* submetidas a diferentes níveis de sombreamento e concentrações de nitrogênio e correlacionar essas atividades com os teores de proteína e parâmetros de crescimento

vegetativo em *J. curcas*, fornecendo desta forma, algumas informações básicas acerca do metabolismo desta espécie oleaginosa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição dos tratamentos

O experimento foi desenvolvido na UNESP/Campus de Ilha Solteira, localizada a 20°43'09" de latitude sul e 51°33'79" de longitude oeste, com altitude em torno de 335 metros, em casa de vegetação, com temperatura máxima de 32°C controlada automaticamente.

Foram semeadas três sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em cada saco de polietileno, com capacidade para três litros de substrato, contendo areia lavada no dia 21 de junho de 2010. O experimento foi irrigado diariamente por aspersão automática, durante três minutos, às 8h e às 18h, a fim de se evitar estresses hídricos que porventura pudessem influenciar no metabolismo das plantas.

As sementes utilizadas foram colhidas em 19 de junho de 2010, na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da UNESP (FEPE), localizada no município de Selvíria – MS. Foram utilizadas sementes provenientes de frutos secos, os quais após colheita foram mantidos em estufa com circulação forçada de ar, a temperatura de 38°C por 24 horas, e logo após serem retiradas dos frutos, foram semeadas, sem qualquer tratamento pré-germinativo, diretamente em areia úmida.

Quinze dias após a emergência, as plantas foram desbastadas com base na uniformidade de altura e número de folhas, deixando-se somente uma planta por saco plástico, constituindo a parcela experimental.

Os tratamentos constituíram-se por três níveis de sombreamento, com 70%, 50% e 30% de cobertura, utilizando-se estruturas metálicas cobertas por telas de poliolefinas, além de um tratamento sem o uso da tela, e por quatro concentrações de nitrato: 0; 15; 30 e 45mM, em esquema fatorial simples (4x4), totalizando 16 tratamentos, com três repetições, no delineamento inteiramente casualizado. As aplicações das soluções nutritivas foram realizadas duas vezes por semana, 40 mL da respectiva solução nutritiva, por planta, o que correspondeu a 0; 37,2; 74,4 e 111,6 mg de NO_3^- a cada aplicação realizada.

Foram preparadas duas soluções nutritivas baseadas na solução de Hoagland e Arnon (1938), uma contendo NO_3^- (Solução 1) e outra sem NO_3^- (Solução 2), conforme a seguir:

- Solução 1: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50mM); KNO_3 (50mM); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20mM); KH_2PO_4 (10mM); H_3BO_3 (0,46mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,091mM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,65 μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3,2 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).
- Solução 2: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2mM); KH_2PO_4 (1mM); $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (2mM); K_2SO_4 (2mM); H_3BO_3 (0,46mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (0,091mM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,65 μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3,2 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).

As duas soluções foram preparadas com macronutrientes e micronutrientes, exceto o ferro, o qual foi adicionado apenas no momento da aplicação, fornecido pela solução Fe-EDTA (33,2 g L⁻¹ Na₂-EDTA; 26 g L⁻¹ FeSO₄ 7H₂O e 3,65g L⁻¹NaOH). Acrescentou-se 1mL da solução Fe-EDTA para cada litro da Solução 1 (após diluição 10x) e da Solução 2.

A partir da Solução 1, acrescentou-se 1,18g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 0,505g KNO_3 para cada litro da solução, para obtenção da solução 30mM, e 2,36g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 1,01g KNO_3 para se obter a concentração de 45mM.

4.2 Descrição das variáveis avaliadas

As determinações laboratoriais foram realizadas nos laboratórios de análise de solos e tecido vegetal (LASTV) e de fisiologia vegetal (LFV), localizados nos Departamentos de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-economia (DFTASE) e de Biologia e Zootecnia (DBZ), respectivamente da UNESP/ Campus de Ilha Solteira.

As análises fisiológicas foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT), utilizando-se três plantas por tratamento (repetições). Todas as análises foram realizadas em folhas e raízes.

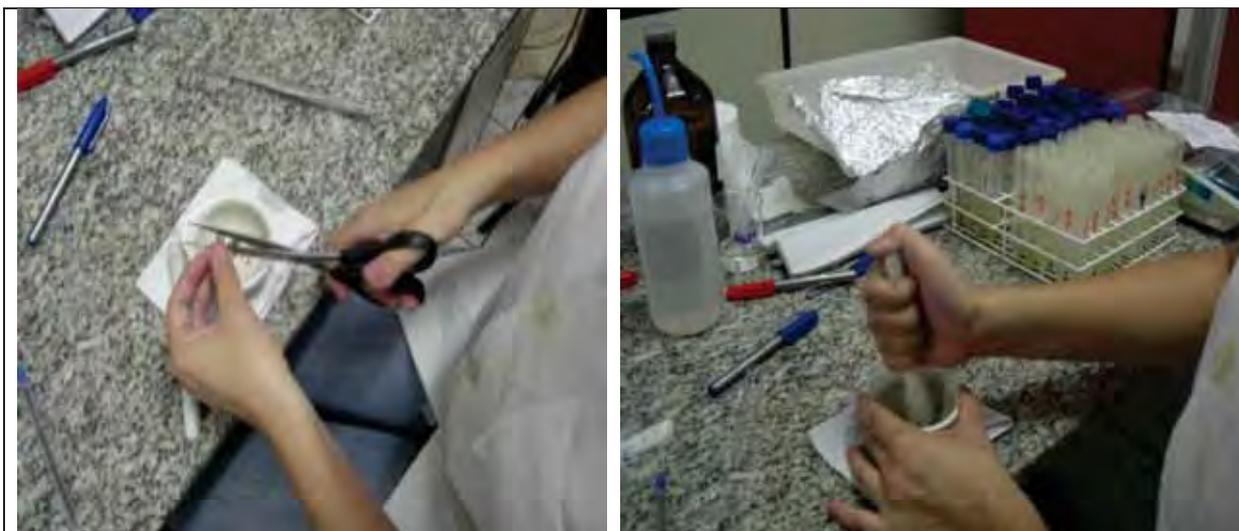
a) Extração de compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados foram extraídos de acordo com o método descrito por Bialeski e Turner (1966). Para 0,1g de material fresco acrescentou-se 1 mL da solução MCW (60 mL de metanol, 25 mL de clorofórmio e 15 mL de H₂O destilada). O material foi macerado, e centrifugado por 15 minutos, a 3000 rpm. Após a centrifugação e separação do sobrenadante, acrescentou-se mais 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de H₂O para cada 4 mL do extrato. O extrato obtido permaneceu em repouso por 24h, em geladeira, para que as fases aquosa, lipídica e clorofórmio fossem separadas e o volume extraído registrado, para

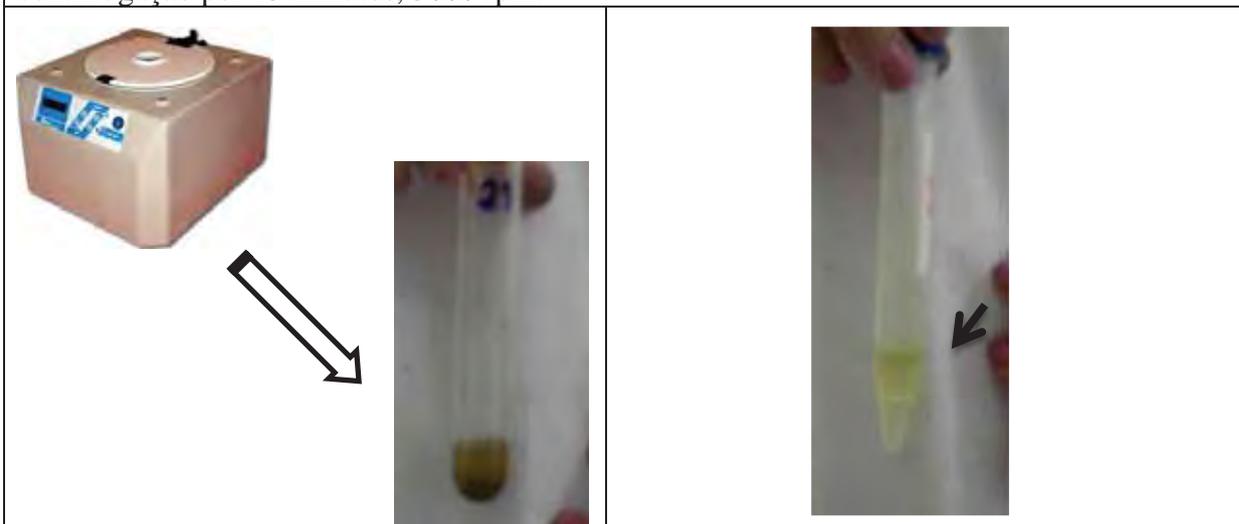
efetuação dos cálculos posteriores. Somente a fase hidrossolúvel (aquosa) foi utilizada para a análise dos compostos nitrogenados (amônia e nitrato) (Figura 4).

O precipitado foi re-suspendido em solução NaOH 0,1 M, a uma relação de 10 mL de solução para cada grama de tecido fresco, e centrifugado novamente por 15 minutos, a 3000 rpm, e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas.

Figura 4- Metodologia de extração de compostos nitrogenados.



1) Após pesagem os tecidos vegetais (folhas e/ou raízes) foram picados e macerados. Acrescentou-se a solução MCW e após homogeneização o material foi submetido à centrifugação por 15 minutos, 3000 rpm.



2) Após centrifugado, separou-se o sobrenadante e acrescentou-se neste 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água, para cada 4 mL do sobrenadante obtido.

3) O extrato obtido permaneceu em geladeira por 24 horas, para separação das fases aquosa (seta) e a fase clorofórmio.

(HIRAKI, 2010).

b) Análise quantitativa de nitrato

Foi utilizado o método de Cataldo et al. (1975) para quantificar as variações na concentração de nitrato presente nos tecidos foliar e radicular de *J. curcas*. Do extrato de tecido obtido através da extração de compostos nitrogenados descrita anteriormente, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL e adicionou-se 0,4 mL de ácido salicílico 5% em H_2SO_4 (p/v). Após 20 minutos em temperatura ambiente, acrescentou-se 9,5 mL de NaOH 2M, lentamente, e após resfriamento, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 410 nm. A concentração de nitrato foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução de nitrato (0 a 4 μ moles) (Figura 5).

Figura 5- Soluções padrão para obtenção de curva padrão de nitrato.



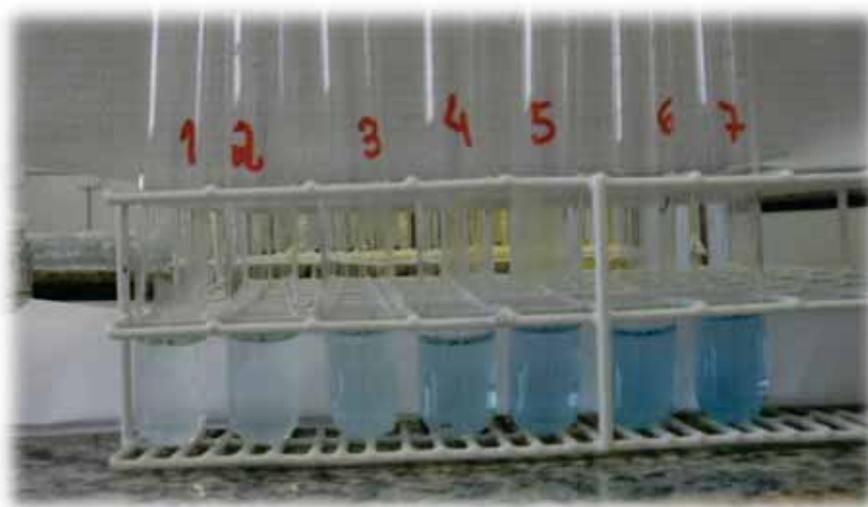
(HIRAKI, 2010).

c) Análise quantitativa de amônia

A análise quantitativa de amônia nos tecidos foliar e radicular foi realizada de acordo com McCullough (1967). Do extrato de tecido obtido da extração já descrita, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL, adicionou-se 0,5 mL de solução fenol (2,5 g fenol+ 12,5 mg nitroprusiato de sódio em volume final de 250 mL) + 0,5 mL de solução fosfato (12,5 g NaOH + 13,4 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ + 2,5 mL NaOCl 5% em volume final de 250 mL). O ensaio foi incubado em banho-maria por uma hora a 37°C, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a

630 nm. A concentração de amônia foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução sulfato de amônia (Figura 6).

Figura 6- Soluções padrão para obtenção da curva padrão de amônia.



(HIRAKI, 2010).

d) Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS)

O teor de proteína total solúvel (PTS) foi realizado utilizando-se a metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando-se o extrato já descrito.

Utilizou-se 100 μL do extrato das raízes e 50 μL do extrato foliar, respectivamente, diluído em 50 μL de NaOH 0,1 M e 5 mL de reagente. O reagente foi preparado com 200 mg de “Comassie Brilliant Blue” + 50 mL de etanol 95%, sob agitação durante duas horas, seguido da adição de 100 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) 85%, e mantido por mais duas horas de agitação. Após este tempo, a solução foi mantida em repouso por 24 horas, completado até 1000 mL com H_2O deionizada, filtrado e guardado em frasco escuro em geladeira.

A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores obtidos foram expressos em mg de proteína g^{-1} de matéria fresca (MF). O padrão utilizado para proteína foi feita com albumina de soro bovino (BSA) na faixa de 10 a 100 μg .

e) **Determinação da atividade da RN**

Na determinação da atividade da RN empregou-se o ensaio *in vivo* descrito por Radin (1973) nos tecidos foliares e radiculares, com as devidas modificações para a espécie em questão.

As amostras de foliares e radiculares de tecido fresco foram coletadas às 7 horas, em dias quentes e ensolarados, armazenadas em sacos plásticos em caixa de isopor com gelo, transportadas até o laboratório e limpas com água deionizada. Foram pesadas amostras de 0,5g de tecido foliar fresco e 1g de raízes, cortadas em pedaços de aproximadamente 5x5 mm, inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio, tampão fosfato 0,1M + KNO₃ 0,1M, pH 7,5. Os tubos de ensaio foram revestidos com folhas de alumínio a fim de se evitar danos oxidativos promovidos pela luz. As amostras foram infiltradas à vácuo três vezes, por dois minutos cada, a fim de facilitar e aumentar a penetração da solução nos tecidos, seguido de introdução de ar. Após a infiltração o ensaio foi incubado em banho-maria a 30°C por uma hora.

Para os tecidos foliares uma alíquota de 100 µL foi retirada e o meio de reação foi preparado com 2,9 mL de água destilada + 1 mL da mistura (v:v) de dicloreto de N-naftiletileno 0,02%, o qual paralisa a reação e sulfanilamida 1% preparada em HCl 1,5N o qual reage e dá a coloração.

Para os tecidos radiculares foi retirada uma alíquota de 500 µL e o meio de reação foi preparado com 0,5 mL de água destilada + 1 mL da mistura de N-naftiletileno e sulfanilamida, preparadas do mesmo modo que os tecidos foliares.

Após 15 minutos durante os quais se deu a reação colorimétrica, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os valores da atividade da RN expressos em µmol NO₂⁻ gMF⁻¹ h⁻¹, determinada pela quantidade de nitrito produzida, utilizando-se uma curva padrão de solução de nitrito (de 0 a 200 µmoles).

f) **Determinação da atividade da Glutamina sintetase (GS)**

Para determinação da atividade da GS foi utilizado o método de Machado et al. (2001). A extração foi feita utilizando-se 1g de tecido foliar fresco, macerado com 10 mL de tampão Tris-HCL, pH 7,2 em almofariz sob gelo e em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos.

Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada ao tubo de reação contendo 0,1 mL de glutamato + 0,1 mL de ATP, 0,1 mL de cloreto de magnésio + 0,1 mL de sulfato de hidroxilamina e 0,1 mL de tampão imidazol. Decorridos 30 minutos foi acrescentado 1,5 mL de FeCl₃ o qual paralisa a reação. A leitura colorimétrica da reação foi realizada em espectrofotômetro a 535 nm e os valores da atividade da GS expressos em $\mu\text{M de } \lambda\text{-GH h}^{-1} \text{ mgMF}^{-1}$.

4.3 Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) através do teste F e testes Tukey em nível de 5% de probabilidade e de regressão para variáveis contínuas, também em nível de 5%, seguindo a metodologia descrita por Gomes (2000), utilizando-se o programa de análises estatísticas SISVAR (FERREIRA, 2000). As correlações lineares de Pearson foram realizadas por meio do programa de análises estatísticas BioEstat (AYRES et al., 2007)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 8 são apresentados os valores do Teste F e a probabilidade estatística, nos quatro períodos avaliados, para a atividade da RN em plantas jovens de *J. curcas*, nos tecidos foliar e radicular. Não houve interações entre os tratamentos efetuados, sendo assim, os efeitos do sombreamento e da concentração de nitrato aplicadas foram analisados separadamente.

Com base nas médias gerais observa-se que a atividade da RN em *J. curcas*, em todos os períodos analisados, foi maior na folha do que na raiz. De acordo com Sodek (2004) o nitrogênio absorvido pelas plantas, em sua grande maioria na forma de nitrato, pode ser assimilado nas raízes ou na parte aérea, porém, a parcela com que cada um desses sistemas contribui para a assimilação de nitrogênio pela planta varia grandemente com a espécie e com as condições dos ambientes. A maioria das espécies herbáceas, incluindo importantes culturas econômicas, reduz nitrato tanto nas raízes como nas folhas. Entretanto, a importância relativa da raiz e folha na assimilação do nitrato depende de dois fatores: a atividade da RN na raiz e a disponibilidade de nitrato no meio.

Aos 30 DAT a atividade média da RN no tecido foliar foi 3,08 $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ gMF}^{-1} \text{ h}^{-1}$, valor 77 vezes maior que a média de atividade verificada nas raízes que foi de 0,04 μmoles

NO_2^- $\text{gMF}^{-1} \text{h}^{-1}$, já no último período avaliado (120 DAT) essa diferença diminuiu para 11 vezes, devido à redução da atividade da RN nas folhas que passou a ser em média 1,48 $\mu\text{moles NO}_2^- \text{gMF}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Tabela 8- Valores do teste F e média geral da atividade da enzima redutase do nitrato em plantas jovens de *Jatropha curcas* L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira SP – 2010.

Tratamentos	30 DAT	60 DAT	90 DAT	120 DAT
Sombreamento (%)				
0	3,81	3,14	1,36	1,53
30	3,29	2,71	1,43	1,44
50	2,92	3,11	1,78	1,64
70	2,29	2,23	1,2	1,18
Concentrações (mM NO_3^-)				
0	2,10	1,32	0,90	0,68
15	2,82	3,45	1,24	1,91
30	3,87	3,26	1,55	1,72
45	3,53	3,16	2,07	1,49
Sombreamento (S)				
	4,12**	4,98**	1,88 ^{ns}	1,26 ^{ns}
Concentração de Nitrato (N)				
	6,12**	27,39**	7,72**	9,36**
S*N				
	0,81 ^{ns}	1,08 ^{ns}	0,98 ^{ns}	1,41 ^{ns}
Média Geral ($\mu\text{moles NO}_2^- \text{gMF}^{-1} \text{h}^{-1}$)				
	3,08	2,8	1,44	1,48
Sombreamento (%)				
0	0,05	0,06	0,05	0,16
30	0,06	0,06	0,06	0,16
50	0,04	0,07	0,05	0,11
70	0,04	0,05	0,04	0,09
Concentrações (mM NO_3^-)				
0	0,03	0,04	0,04	0,11
15	0,05	0,07	0,06	0,14
30	0,05	0,07	0,05	0,13
45	0,04	0,06	0,05	0,13
Sombreamento (S)				
	2,71*	1,50 ^{ns}	3,76*	4,53**
Conc. Nitrato (N)				
	5,04**	4,42**	5,58**	0,71 ^{ns}
S*N				
	0,61 ^{ns}	0,83 ^{ns}	1,13 ^{ns}	1,34 ^{ns}
Média Geral ($\mu\text{moles NO}_2^- \text{gMF}^{-1} \text{h}^{-1}$)				
	0,04	0,06	0,05	0,13

Significativo pelo teste F * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, ^{ns} não significativo.

A maior atividade da RN nas folhas era esperada, já que a assimilação redutiva do nitrogênio é um processo dispendioso energeticamente às plantas, razão porque em muitas espécies ocorre predominantemente nas folhas, centros de energia (ATP) e de agentes redutores (fornecedores de elétrons). O processo de redução do nitrogênio necessita da

fotossíntese por carboidratos e energia, consumindo 12 ATPs a cada nitrogênio assimilado pela planta (EPSTAIN; BLOOM, 2006). Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira et al. (2005) em pupunheira (*Bactris gasipaes*) os quais verificaram atividade da RN nas folhas muito superior àquela encontrada nas raízes.

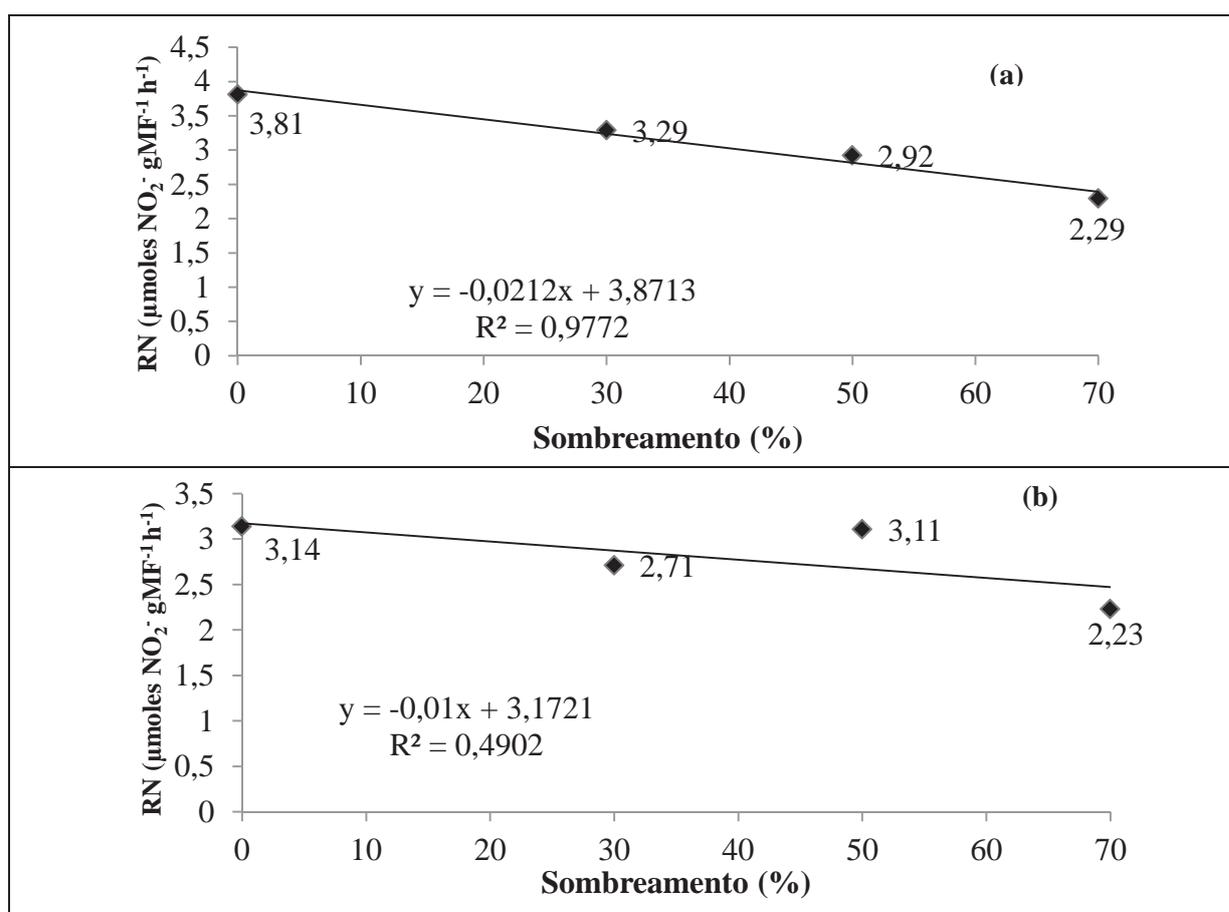
Assim como verificado neste trabalho, em culturas como o algodão (*Gossypium hirsutum*) (RADIN, 1977 citado por SODEK, 2004), cevada (CHANTAROTWONG et al., 1976; ASLAM; HUFFAKER, 1982; LEWIS et al., 1982 citados por CARELLI; FAHL, 1991), soja (*Glycine max*) (CRAFTS-BRANDNER; HARPER, 1982 citado por CARELLI; FAHL, 1991), café (*Coffea arabica*) (QUEIROZ et al., 1985, CARELLI, 1987 citado por CARELLI; FAHL, 1991) e milho (*Zea mays*) (HAGEMAN; FLESHER, 1960; WALLACE, 1973 citado por CARELLI; FAHL, 1991; SODEK, 2004), os níveis de atividade da RN são mais altos na parte aérea do que nas raízes. Porém em outras espécies, como girassol (WEISSMAN, 1972 citado por CARELLI; FAHL, 1991), tremoço, rabanete (PATE, 1980 citado por CARELLI; FAHL, 1991), e seringueira (LEMOS et al., 1999) sendo esta última uma planta pertencente à mesma família de *J. curcas* (Euphorbiaceae), as raízes apresentaram atividade bem maior do que a das folhas, por isso há a necessidade de estudos da atividade da RN em diferentes partes da planta.

No tecido foliar as médias de atividade da RN foram diminuindo gradativamente a cada período avaliado, já em relação às raízes verificou-se apenas um ligeiro aumento na atividade da RN no último período analisado (120 DAT). A redução da atividade RN no decorrer do período analisado foi também relatada em *Bactris gasipaes* (OLIVEIRA et al., 2007), em *Phaseolus lunatus* (SILVEIRA et al., 2001) e em *Coffea arabica* (REIS, 2007) sendo que neste último trabalho a redução da atividade da RN ao longo dos períodos analisados foi atribuída à fertilização efetuada no início do período experimental e à precipitação durante a condução do experimento. Entretanto, no presente trabalho, uma vez que as condições de temperatura e umidade relativa do ar foram controladas, bem como o fornecimento das soluções nutritivas foram sempre efetuadas da mesma maneira, a redução nas médias gerais de atividade foliar de RN em *J. curcas*, poderia ser explicada por dois motivos. O primeiro deles deve-se provavelmente à senescência natural dos tecidos, uma vez que as folhas amostradas estavam sempre na mesma posição das plantas (primeira e segunda folhas verdadeiras da base para o ápice). Pereira-Neto et al. (1989) relatou que em folhas de *Pueraria phaseoloides* ocorreu redução da atividade da RN no sentido ápice-base, e que resultados semelhantes foram verificados também em soja. Segundo este autor, a maior atividade da enzima em folhas jovens, deve-se a maior concentração de nitrato e de

fotoassimilados e a maior capacidade de síntese de proteínas nessas folhas. O segundo possível motivo que poderia ter provocado a redução de atividade da RN nas folhas ao longo do tempo, deve-se ao auto sombreamento das folhas da camada basal, provocado pelo aumento no número médio de folhas.

Aos 30 e 60 DAT ocorreram diferenças na atividade da RN nos tecidos foliares em função dos níveis de sombreamento testados (Tabela 8). Nestes dois períodos o ajuste de regressão foi linear, decrescendo a atividade da RN com o a redução da luminosidade incidente (Figura 7). Aos 30 DAT a atividade da RN sob o maior nível de sombreamento (70% de sombreamento) foi 40% menor que na ausência de cobertura. Aos 60 DAT a porcentagem de redução, para a mesma comparação, foi da ordem de 30%.

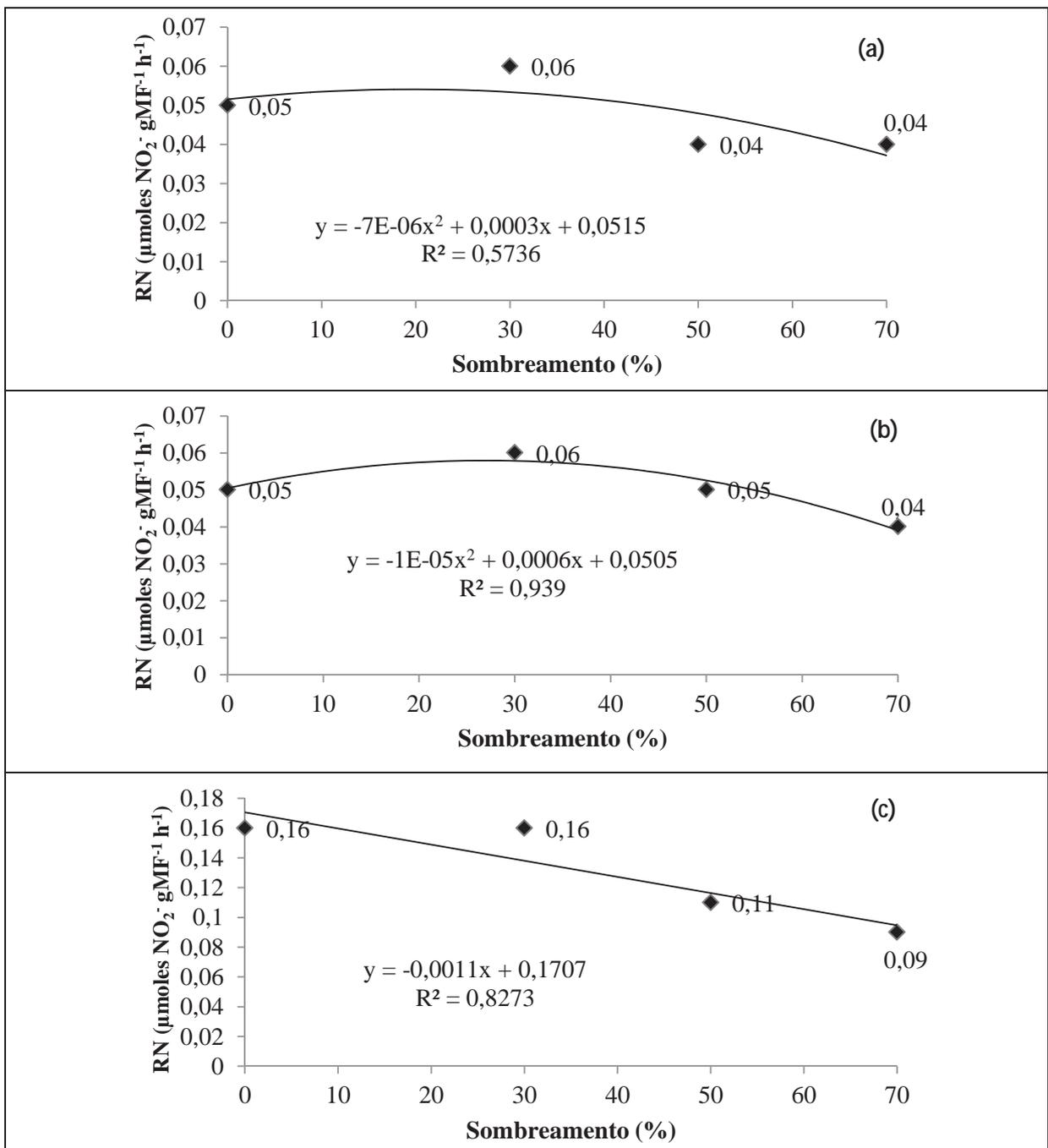
Figura 7- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) no tecido foliar, em plantas jovens de *Jatropha curcas* L., em função dos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a) e 60 (b) dias após o início dos tratamentos (DAT).



(HIRAKI, 2011).

Nas raízes verificou-se diferença na atividade da RN aos 30, 90 e 120 DAT nos diferentes sombreamentos testados (Tabela 8). Aos 30 e 90 DAT os ajustes de regressão foram quadráticos tendendo a um ligeiro aumento de atividade sob o sombreamento de 30% e reduzindo a atividade após esse nível. Aos 120 DAT, assim como aconteceu nas folhas, a atividade da RN, diminuiu linearmente com o aumento do sombreamento (Figura 8).

Figura 8- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) em raízes de *Jatropha curcas* nos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a), 90 (b) e 120 (c) dias após o início dos tratamentos.



(HIRAKI, 2011).

A influência da luz sobre a RN foi observada mudas de *Coffea arabica* em experimento realizado por Carelli e Fahl (2006). Os autores relataram que os diferentes regimes de irradiância (20, 50 e 100% da luz solar) influenciam a partição da RN entre folhas e raízes, e que sob altos níveis de irradiância e nitrato, a redução do nitrato ocorre mais nas folhas que nas raízes e vice-versa.

Em condições ótimas de crescimento, a capacidade de redução do nitrato é aproximadamente, o dobro da necessidade da planta. A atividade da RN varia durante o dia, apresentando baixa atividade no escuro para a maioria das espécies (STITT, 1987; SCHEIBLE et al., 1997). Em condições normais de ativação e na presença de luz, a sua ação seria da ordem de 70 a 90%, reduzindo para 10 a 30% no escuro. Entretanto, a luz não é um sinal direto para a atividade dessa enzima, pois mesmo sob intensa e contínua luminosidade, a RN é inativa quando falta gás carbônico, indicando que a fotossíntese é requerida para sua ativação, sendo provavelmente os fotoassimilados exportados para fora do cloroplasto os sinalizadores para a ativação da RN (KAISER; HUBER, 2001).

A quantidade de carboidratos, a luminosidade disponível e outros fatores ambientais, como a disponibilidade de água, ativam a fosfatase, enzima responsável pela desfosforilação de vários resíduos de serina na proteína RN, favorecendo sua atividade. A ausência de luz e de magnésio estimulam a fosforilação dos resíduos de serina os quais interagem com uma proteína inibidora resultando na desativação da RN (KAISER et al., 1999).

O sombreamento interferiu nas concentrações de nitrato nas folhas e raízes de *J. curcas*. Nas folhas detectou-se diferenças em todos os períodos avaliados, já nas raízes somente aos 60 e 90 DAT (Tabela 9).

As médias gerais dos teores foliares de nitrato aumentaram gradativamente ao longo dos períodos amostrados sendo 20,02; 21,63; 32,6 e 39,25 $\mu\text{moles NO}_3^- \text{ g MF}^{-1}$, aos 30, 60 90 e 120 DAT, respectivamente, comportamento inverso ao acontecido com a atividade média da RN nos mesmos períodos a qual foi diminuindo com o passar dos períodos analisados. Levando-se em consideração que as folhas amostradas em todos os períodos eram sempre a primeira e a segunda folhas verdadeiras a partir da base do caule, parece haver uma redução na atividade da RN nos tecidos foliares à medida que eles vão envelhecendo na planta, e tal redução de atividade, faz com que o substrato enzimático (nitrato) acumule-se nos tecidos foliares.

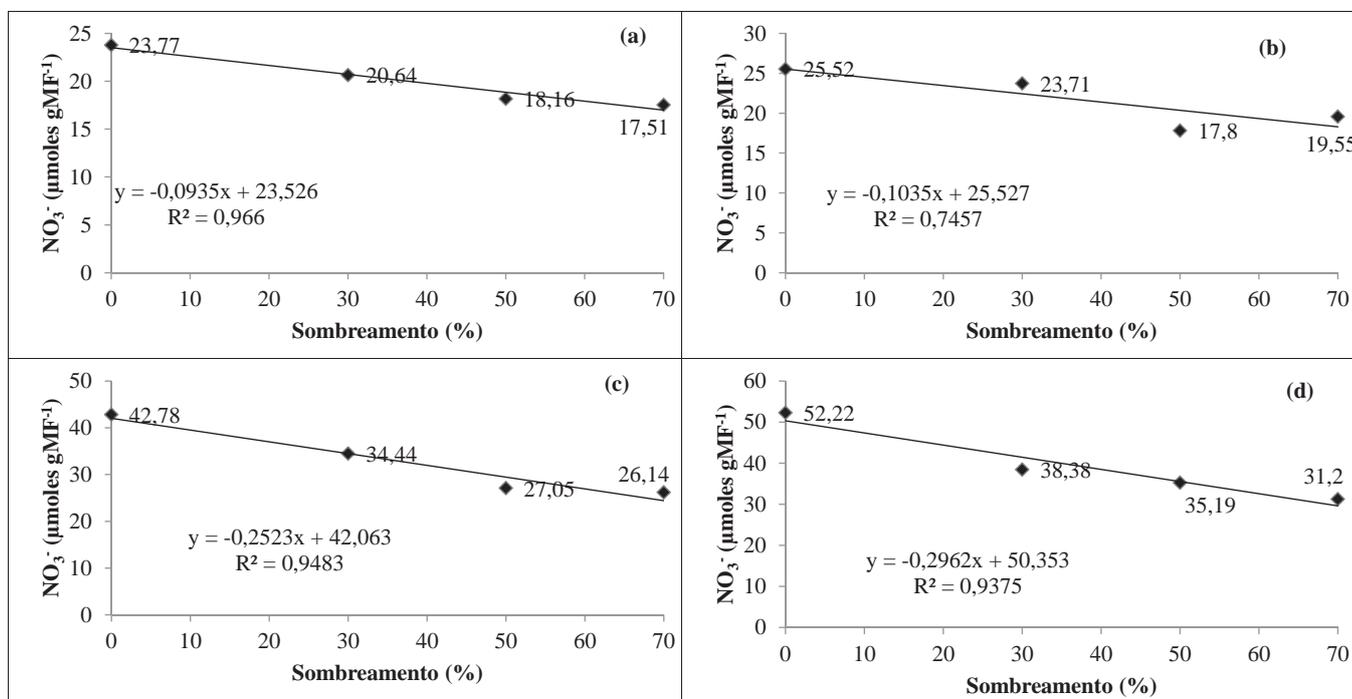
Tabela 9- Valores do teste F e média geral dos teores de nitrato presentes nos tecidos foliares e radicular em plantas jovens de *Jatropha curcas* L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.

Tratamentos	30 DAT	60 DAT	90 DAT	120 DAT
F O L H A S				
Sombreamento (%)				
0	23,77	25,52	42,78	52,22
30	20,64	23,71	34,46	38,38
50	18,16	17,8	27,05	35,19
70	17,51	19,55	26,14	31,20
Concentrações (mM NO ₃ ⁻)				
0	20,11	17,26	30,56	41,38
15	19,61	19,52	29,94	36,37
30	21,14	23,59	33,63	38,49
45	19,21	26,21	36,27	40,75
Sombreamento (S)	5,89**	6,76**	17,84**	18,69**
Conc. Nitrato (N)	0,51 ^{ns}	8,49**	2,56 ^{ns}	1,17 ^{ns}
S*N	0,62 ^{ns}	1,20 ^{ns}	1,46 ^{ns}	1,31 ^{ns}
Média Geral (μmoles NO ₃ ⁻ g MF ⁻¹)	20,02	21,63	32,6	39,25
R A Í Z E S				
Sombreamento (%)				
0	19,49	33,74	24,12	18,23
30	22,60	29,38	26,85	18,05
50	19,02	27,20	18,21	15,57
70	18,21	24,37	18,22	13,79
Concentrações (mM NO ₃ ⁻)				
0	12,91	9,83	9,59	8,81
15	19,74	25,80	17,99	12,84
30	22,89	38,18	26,09	19,31
45	23,77	40,86	33,72	24,68
Sombreamento (S)	1,33 ^{ns}	5,11**	4,65**	1,62 ^{ns}
Conc. Nitrato (N)	8,74**	65,80**	26,63**	17,65**
S*N	0,39 ^{ns}	1,11 ^{ns}	1,26 ^{ns}	0,56 ^{ns}
Média Geral (μmoles NO ₃ ⁻ g MF ⁻¹)	19,82	28,67	21,85	16,41

Significativo pelo teste F *p<0,05 e **p<0,01, ^{ns} não significativo.

Analisando-se cada um dos períodos avaliados separadamente, nota-se que assim como a atividade da RN os níveis foliares de nitrato, em cada um dos períodos avaliados diminuiu linearmente com o aumento do sombreamento (Figura 9).

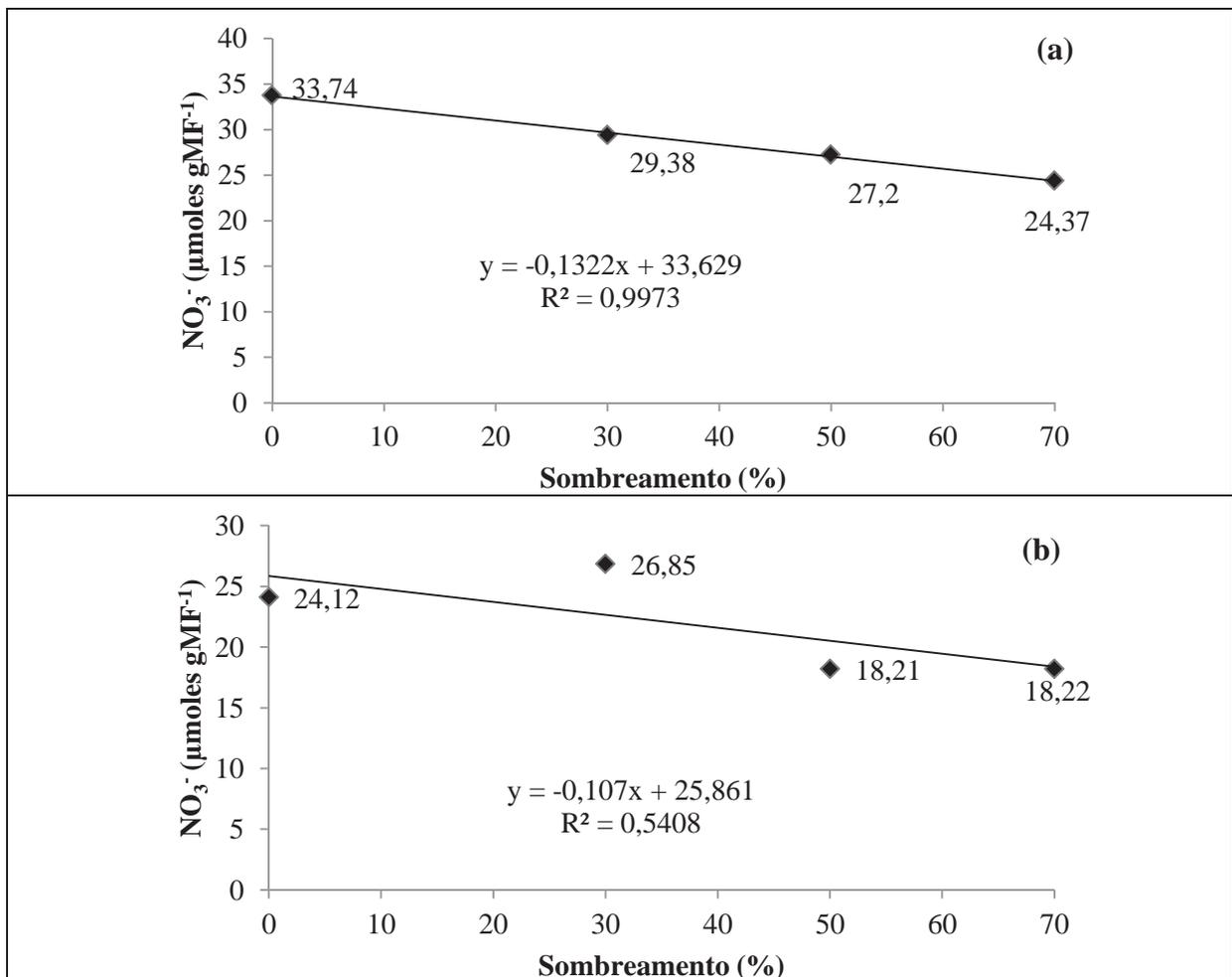
Figura 9- Nitrato solúvel (NO_3^-) em folhas de *Jatropha curcas* função dos níveis de sombreamento testados aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos.



(HIRAKI, 2011).

Nas raízes, nos períodos onde houve diferença estatística (60 e 90 DAT), o aumento do sombreamento, assim como acontecido nas folhas, também causou uma redução no acúmulo de nitrato solúvel (Figura 10). Carelli et al. (1990) relataram aumento na concentração foliar de nitrato em plantas expostas à maior luminosidade. Tais resultados indicam que a maior luminosidade incidente favorece o acúmulo de nitrato nos tecidos foliar e radicular, o que conseqüentemente, devido à maior quantidade de substrato presente, favorece a atividade da RN.

Figura 10- Nitrato solúvel (NO_3^-) em raízes de *Jatropha curcas* função dos níveis de sombreamento testados aos 60 (a) e 90 (b) dias após o início dos tratamentos.



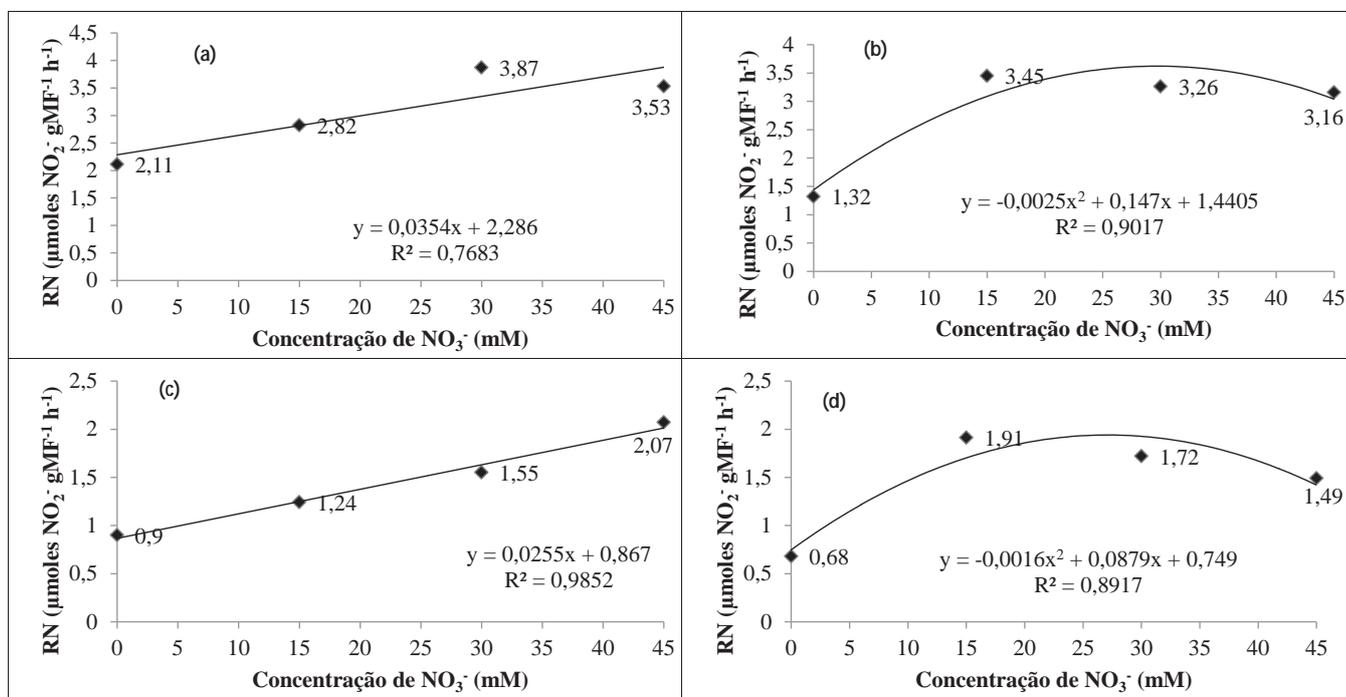
(HIRAKI, 2011).

A atividade da RN em folhas e raízes pode ser induzida pela presença do substrato (nitrato), assim, a redução nos teores de substrato com a redução da incidência luminosa,

explica também a queda nas médias de atividade da RN em *J. curcas*. A indução da atividade da RN pelo substrato é relativamente forte, pois quando a quantidade de substrato diminui no interior da célula sua atividade se reduz rapidamente (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As concentrações de nitrato aplicadas influenciaram a atividade da RN em folhas e raízes em todos os períodos avaliados, com exceção das raízes aos 120 DAT (Tabela 8). Para as folhas os ajustes de regressão foram lineares aos 30 e 90 DAT, aumentando com as maiores concentrações de nitrato aplicadas, e quadráticos aos 60 e 120 DAT (Figura 11). Derivando-se essas regressões (aos 60 e 120 DAT) obteve-se as concentrações de 29,4 e 27,5mM, respectivamente, nas quais ocorreria a máxima atividade da RN nas folhas de *J. curcas*, e concentrações maiores a essas resultaram em decréscimos na atividade enzimática, o que prejudicaria o metabolismo do nitrogênio nesta espécie. A variação no comportamento da atividade da RN o tecido foliar durante os períodos amostrados, isto é, os ajustes de regressão hora quadrático e hora linear, podem ser explicados por pequenas variações na temperatura ou umidade relativa do ar durante as amostragens, o que poderia também ter interferido na atividade dessa enzima, além da concentração de nitrato aplicada.

Figura 11- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) em folhas de *Jatropha curcas* cultivadas em função das concentrações de nitrato aplicadas, aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos.

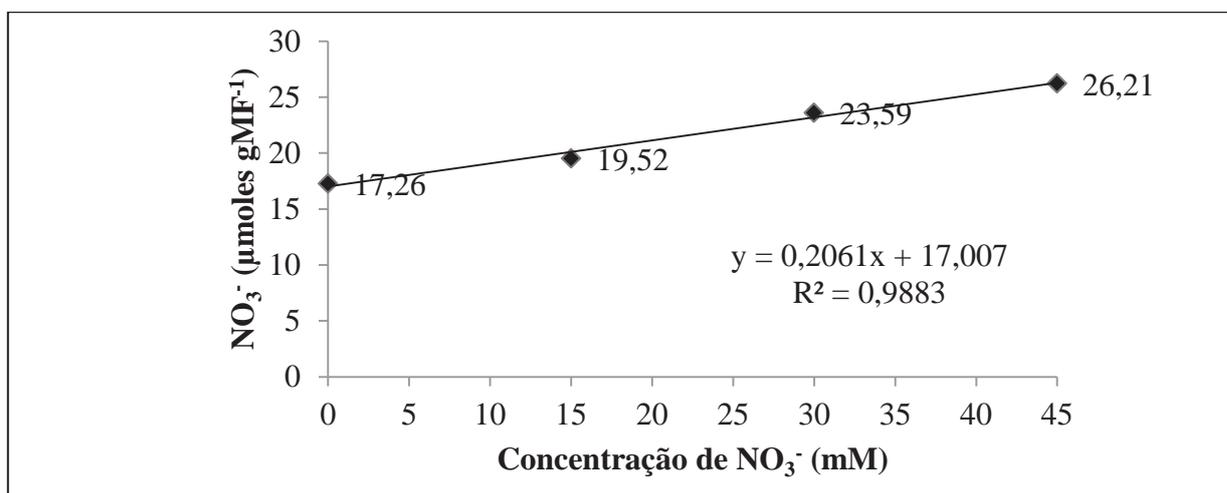


(HIRAKI, 2011).

Verificou-se que as concentrações de nitrato aplicadas tiveram efeitos significativos sobre os teores foliares de nitrato somente aos 60 DAT, ajustando-se ao modelo linear de equação (Figura 12).

Através da análise das Figuras 11 e 12, nota-se que há um acúmulo de nitrato nos tecidos foliares que excede a capacidade de redução da enzima RN nestes mesmos tecidos aos 60 DAT, o que poderia ser caracterizado como um consumo luxo, já que o nitrato aplicado mesmo sendo absorvido do substrato, não é reduzido, impedindo assim sua posterior fixação em esqueletos carbônicos.

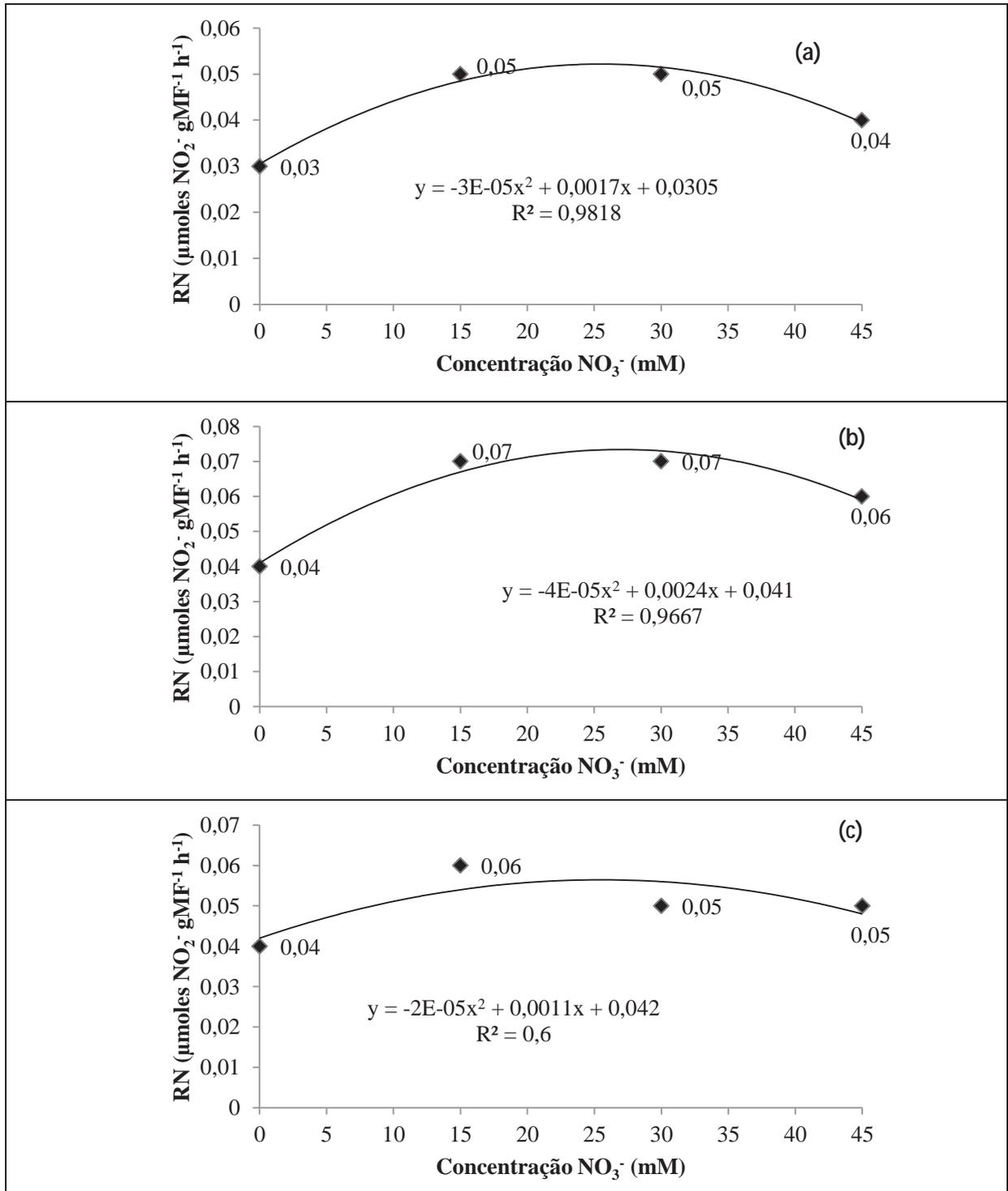
Figura 12- Concentração de nitrato foliar em *Jatropha curcas* L., aos 60 dias após início dos tratamentos, em função das concentrações de nitrato aplicadas.



(HIRAKI, 2011).

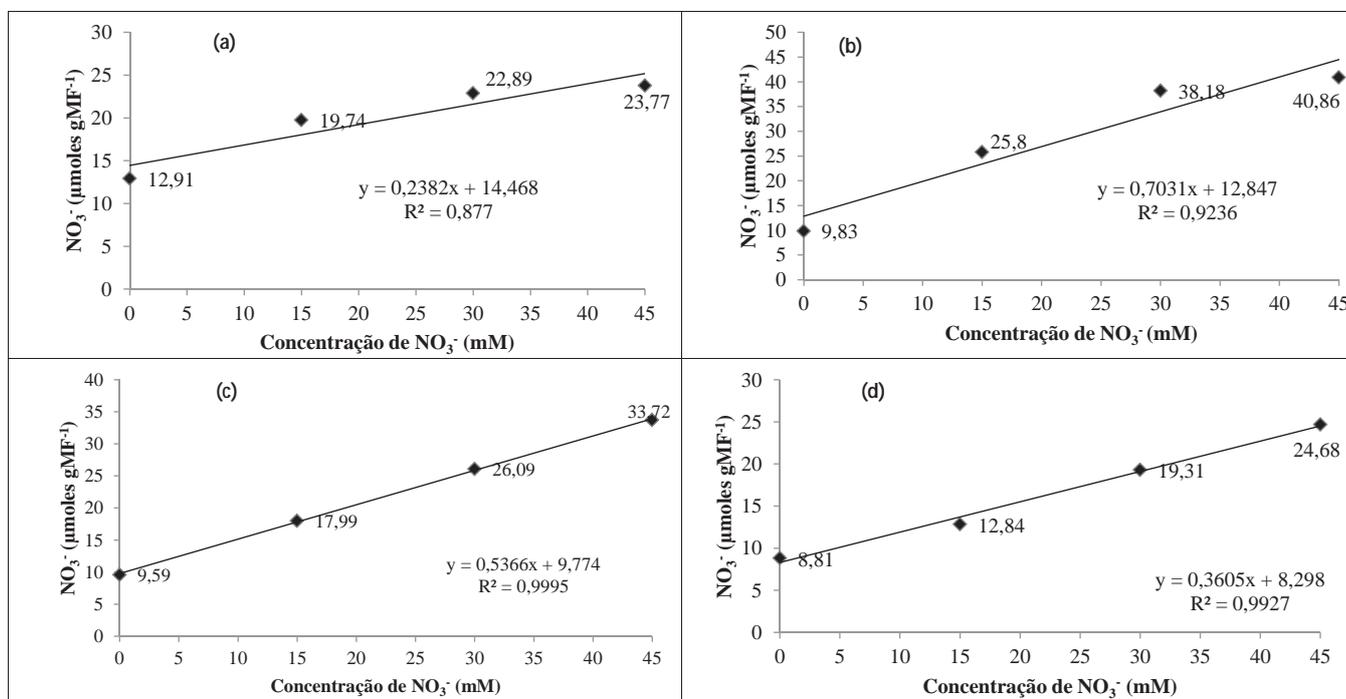
Nas raízes as equações de regressão para a atividade da RN em função das concentrações de nitrato ajustaram-se ao modelo quadrático com pontos de atividade máxima variando entre as concentrações de 25 a 30 mM (Figura 13). As concentrações de nitrato aplicadas influenciaram nos teores radiculares de nitrato solúvel em todos os períodos analisados (Tabela 9) aumentando linearmente com o aumento das concentrações aplicadas (Figura 14).

Figura 13- Atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) em raízes de *Jatropha curcas* L. em função das concentrações de nitrato aplicadas, aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) dias após o início dos tratamentos.



(HIRAKI, 2011).

Figura 14- Nitrato solúvel em raízes de plantas jovens de *Jatropha curcas* L. em função das concentrações de nitrato aplicadas em solução nutritiva aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos.



(HIRAKI, 2011).

Comparando-se os resultados das concentrações de nitrato solúvel nos dois tecidos analisados (que ajustaram-se à modelos lineares), e as atividades da RN obtidas nestes mesmos tecidos (as quais obteve-se ajustes de regressão quadráticos), verifica-se que a presença do substrato nos tecidos não é o único regulador da atividade da RN, pois mesmo com o aumento de nitrato no meio, há um ponto a partir do qual a atividade da RN passa a ser reduzida. Em alguns trabalhos, com diferentes espécies, relatou-se a presença de um ponto de máxima atividade enzimática, a partir do qual mesmo com a adição de nitrogênio ao meio, a enzima RN estabiliza ou reduz sua atividade (REIS; FURLANI JUNIOR; HAGA, 2007; VIANA 2007). A capacidade de redução do nitrato é controlada em relação ao nível metabólico total da planta, por sensores e rotas de tradução de sinais. A resposta das plantas à quantidade de nitrato depende também de outros fatores, além do substrato, entre os quais o material genético e o ambiente como, por exemplo, a luz, os quais influenciam a RN, bem como outros componentes do metabolismo do nitrato (CAMPBELL, 1999).

Não houve interação entre os níveis de sombreamento e as concentrações de nitrato aplicadas para a atividade da enzima Glutamina sintetase (GS). Nas folhas, tanto o sombreamento como o nitrato aplicado tiveram influência sobre a atividade desta enzima, nas raízes por outro lado, verificou-se diferenças somente em relação às concentrações de nitrato aplicadas (Tabela 10).

Com base na observação das médias gerais obtidas em todos os períodos analisados a maior atividade da GS deu-se nos tecidos foliares sendo praticamente duas vezes maior quando comparado à atividade da GS nas raízes. Resultados semelhantes foram relatados em trabalhos desenvolvidos com mudas de seringueira (*Hevea brasiliensis*) cultivadas com diferentes concentrações de nitrato e/ou amônio em solução nutritiva (DELÚ FILHO et al., 1998, LEMOS et al., 1999).

O fato de algumas plantas tais como a seringueira (*H. brasiliensis*) (DELÚ FILHO et al., 1998) e de acordo com os resultados verificados neste trabalho também o pinhão-manso (*J. curcas*), apresentarem grande capacidade de assimilação do amônio nas lâminas foliares pode representar uma vantagem do ponto de vista ecofisiológico, uma vez que o amônio liberado durante o processo fotorrespiratório teria condições de ser reassimilado pela planta, reduzindo as perdas para o meio pela volatilização.

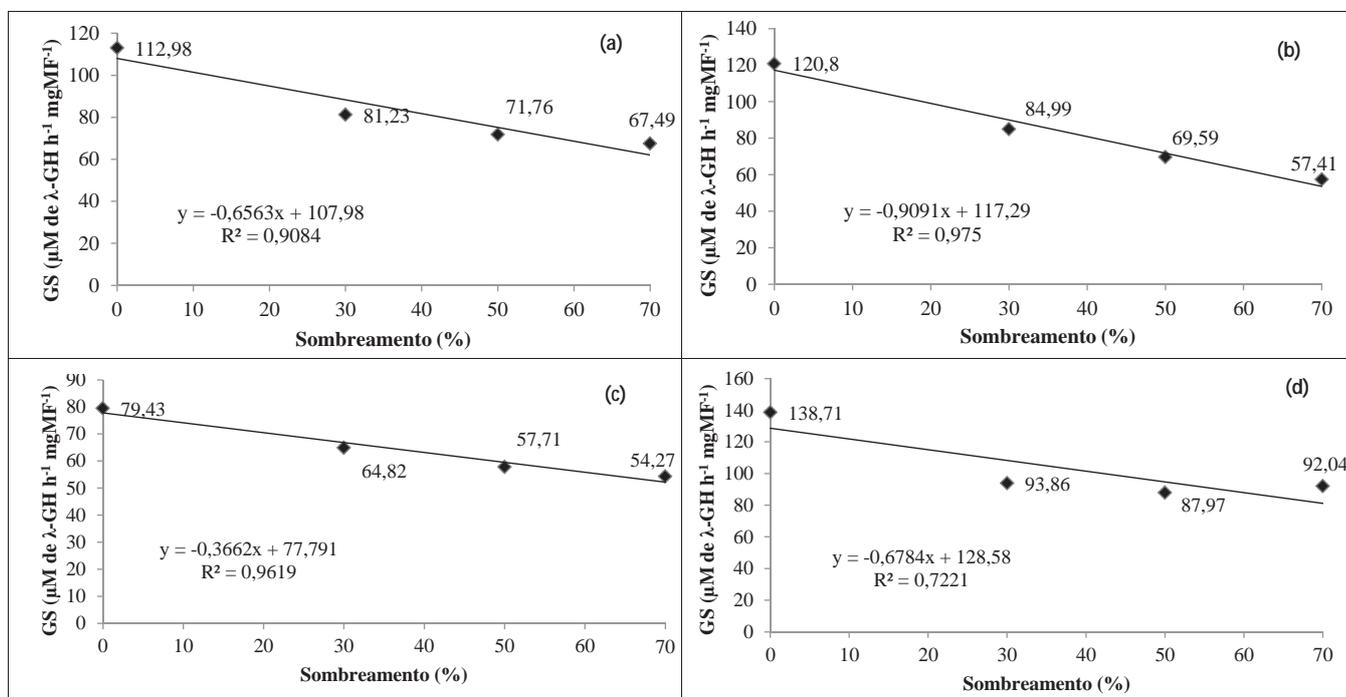
Tabela 10- Valores do teste F e média geral da atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) nos tecidos foliar e radicular em plantas jovens de *Jatropha curcas* L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.

Tratamentos	30 DAT	60 DAT	90 DAT	120 DAT
FOLHAS				
Sombreamento (%)				
0	112,98	120,80	79,43	138,71
30	81,23	84,99	64,82	93,86
50	71,76	69,59	57,71	87,97
70	67,49	57,41	54,27	92,04
Concentrações (mM NO ₃ ⁻)				
0	82,79	69,01	66,94	112,42
15	81,85	84,79	62,42	99,57
30	83,95	92,13	61,07	98,65
45	84,87	86,86	65,81	101,94
Sombreamento (S)	37,19**	25,13**	6,73**	13,27**
Conc. Nitrato (N)	0,15 ^{ns}	3,29*	0,42 ^{ns}	0,94 ^{ns}
S*N	0,97 ^{ns}	1,47 ^{ns}	1,44 ^{ns}	0,92 ^{ns}
Média Geral	83,36	83,2	64,06	103,14
RAÍZES				
Sombreamento (%)				
0	39,21	41,91	36,12	39,61
30	41,15	43,73	35,90	43,81
50	39,44	44,71	36,21	37,41
70	39,17	38,32	34,21	44,98
Concentrações (mM NO ₃ ⁻)				
0	32,57	36,65	25,53	35,54
15	46,41	46,54	43,37	49,32
30	40,28	43,00	38,46	39,37
45	39,72	42,49	35,08	41,59
Sombreamento (S)	0,11 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,92 ^{ns}
Conc. Nitrato (N)	3,99**	0,89 ^{ns}	8,92**	2,46 ^{ns}
S*N	0,30 ^{ns}	0,98 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,35 ^{ns}
Média Geral	39,75	42,17	35,61	41,45

Significativo pelo teste F *p<0,05 e **p<0,01, ^{ns} não significativo.

Em cada um dos períodos analisados (30, 60, 90 e 120 DAT) a atividade foliar da GS diminuiu linearmente com o aumento do sombreamento (Figura 15), assim como já relatado para a atividade da RN. Esse comportamento da atividade enzimática indica a importância da luz na geração de energia para a assimilação do amônio, seja proveniente da redução do nitrato transportado à parte aérea ou daquele proveniente da fotorrespiração.

Figura 15– Comportamento da atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) em folhas de plantas jovens de *Jatropha curcas* L., em função dos dos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) dias após o início dos tratamentos.



(HIRAKI, 2011).

De maneira semelhante à RN, a regulação da atividade da GS pode ser induzida por diferentes estímulos externos ou fisiológicos, dependendo do órgão da planta ou da isoforma da enzima (PUJADE-RENAUD et al., 1994). A luz, por exemplo, aumenta a quantidade de RNAm da isoforma da enzima GS presente nos cloroplastos e plastídeos (GS2) em folhas de ervilha, fumo e tomate (BECKER et al., 1992). Edwards e Coruzzi (1989) observaram que a expressão de um gene nuclear para GS2 é afetada, sensivelmente, pela luminosidade. Tjaden et al. (1995) descreveram a flutuação da atividade da enzima GS2 conforme a quantidade de radiação e da atividade da RN, observando aumentos da GS na presença de luz concomitantemente ao aumento da atividade da RN assim como observado neste trabalho em *J. curcas*.

As concentrações de amônia nos tecidos foliar e radicular nos tratamentos realizados são apresentadas na Tabela 11. Não se verificou interação entre o sombreamento e as concentrações de nitrato aplicadas sobre esta análise. Nos tecidos foliar e radicular ocorreu diferença nas concentrações de amônia solúvel em relação ao sombreamento testados aos 120 e 90 DAT, respectivamente, com ajustes de regressão lineares nos dois períodos, porém de maneira inversa (Figura 16). Enquanto nas folhas o aumento do sombreamento reduziu a concentração da amônia, assim como verificado para a enzima GS para a qual a amônia serve como substrato, nas raízes houve um ligeiro aumento de sua concentração com o aumento do sombreamento.

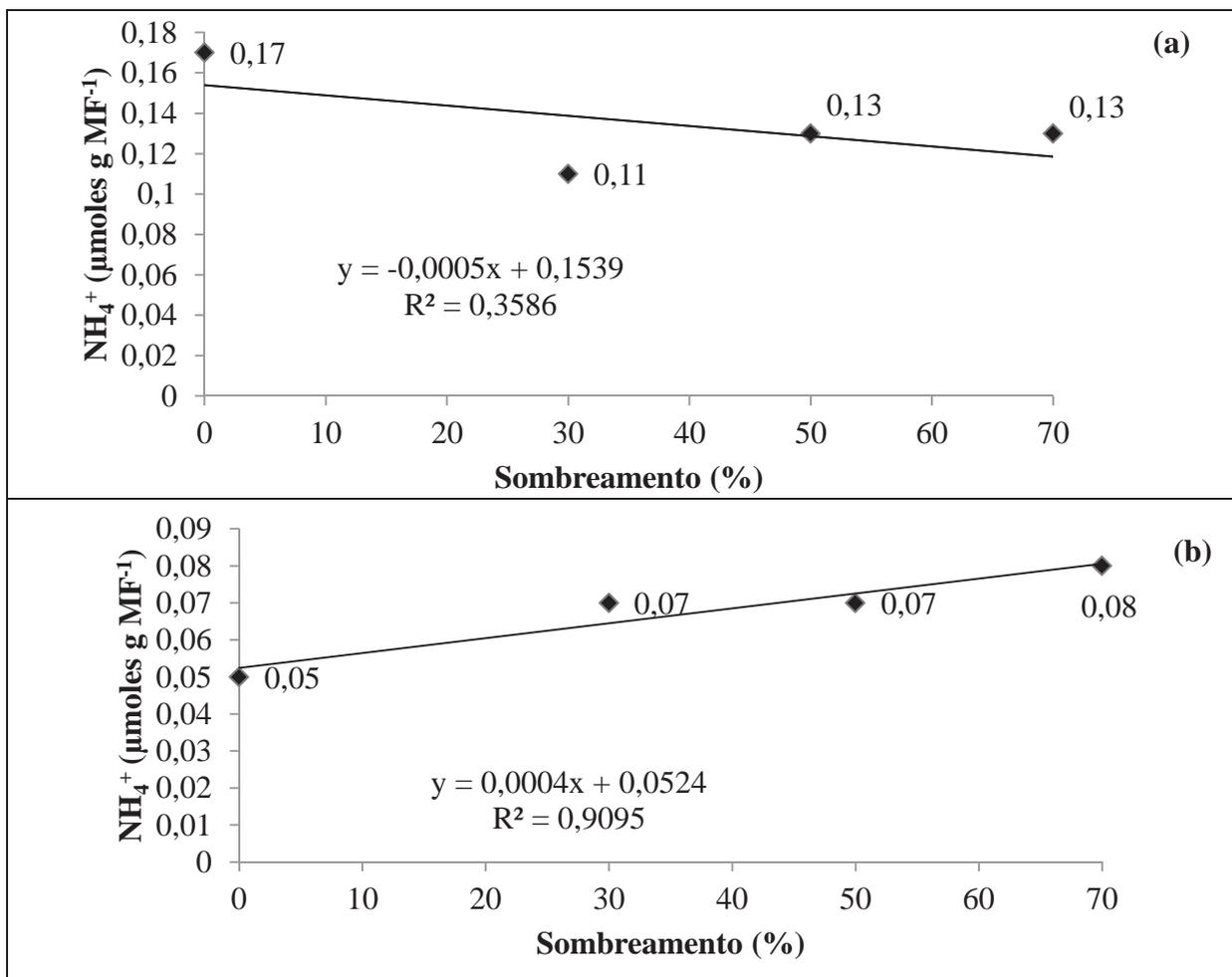
Apesar das diferenças nas concentrações de amônia verificadas neste trabalho, nota-se que todas as médias obtidas nos tratamentos são muito próximas à zero, pois não foi utilizada fonte amoniacal alguma para nutrição das plantas, sendo, portanto, toda a amônia resultante essencialmente do metabolismo da planta, ou seja, produto do processo de redução do nitrato o qual não pode ser acumulado, devido à sua toxicidade aos tecidos, portanto, todo o amônio produzido deve ser rapidamente assimilado através da incorporação em compostos orgânicos evitando seu acúmulo nos tecidos. A enzima responsável por tal incorporação é a GS, que catalisa a união do NH_4^+ com o ácido glutâmico para formar glutamina, a qual é altamente eficiente. Dessa forma, em condições normais, o NH_4^+ é mantido em concentrações muito baixas no tecido foliar (MIFLIN et al., 1981).

Tabela 11- Valores do teste F e média geral dos teores de amônia (NH_4^+) nos tecidos foliares e radicular em plantas jovens de *Jatropha curcas* L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.

Tratamentos	30 DAT	60 DAT	90 DAT	120 DAT
F O L H A S				
Sombreamento (%)				
0	0,56	0,18	0,32	0,17
30	0,58	0,24	0,45	0,11
50	0,52	0,18	0,37	0,13
70	0,55	0,19	0,40	0,13
Concentrações (mM NO_3^-)				
0	0,19	0,06	0,26	0,15
15	0,53	0,23	0,35	0,14
30	0,79	0,25	0,39	0,13
45	0,69	0,25	0,54	0,13
Sombreamento (S)				
	0,29 ^{ns}	0,8 ^{ns}	3,3 ^{ns}	4,38 ^{**}
Conc. Nitrato (N)				
	31,7 ^{**}	8,44 ^{**}	17,29 ^{**}	1,18 ^{ns}
S*N				
	2,23 [*]	1,27 ^{ns}	1,07 ^{ns}	1,06 ^{ns}
Média Geral ($\mu\text{moles de NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1}$)				
	0,56	0,2	0,39	0,14
R A Í Z E S				
Sombreamento (%)				
0	0,12	0,08	0,05	0,15
30	0,19	0,08	0,07	0,17
50	0,23	0,08	0,07	0,16
70	0,21	0,08	0,08	0,16
Concentrações (mM NO_3^-)				
0	0,19	0,08	0,05	0,12
15	0,19	0,09	0,07	0,17
30	0,19	0,08	0,07	0,17
45	0,18	0,07	0,07	0,18
Sombreamento (S)				
	1,01 ^{ns}	0,49 ^{ns}	4,91 ^{**}	0,76 ^{ns}
Conc. Nitrato (N)				
	0,01 ^{ns}	1,36 ^{ns}	1,61 ^{ns}	8,23 ^{**}
S*N				
	0,24 ^{ns}	0,26 ^{ns}	1,05 ^{ns}	0,61 ^{ns}
Média Geral ($\mu\text{moles de NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1}$)				
	0,19	0,08	0,07	0,16

Significativo pelo teste F * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, ^{ns} não significativo.

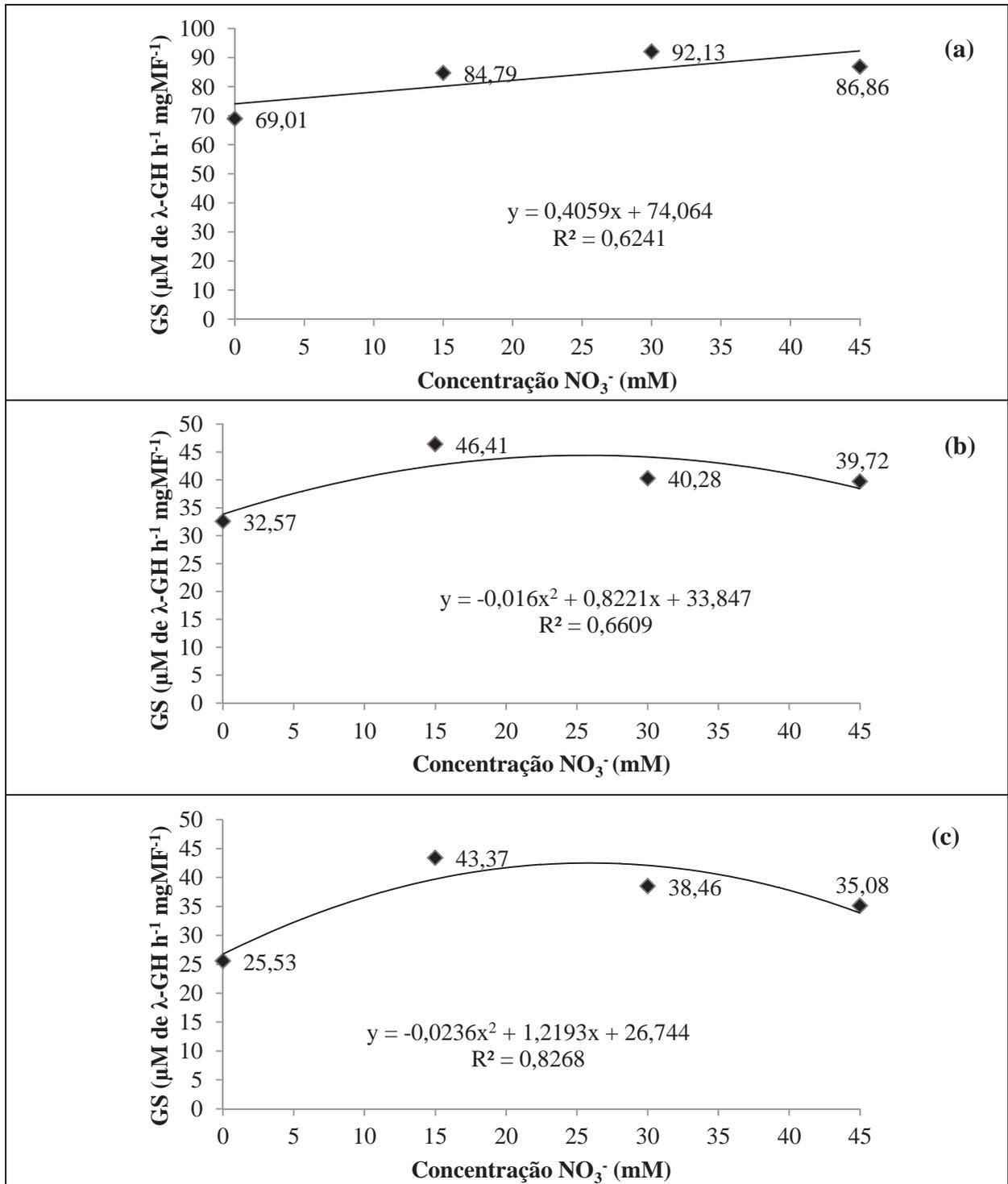
Figura 16- Concentração de amônia (NH_4^+) em folhas (a) e raízes (b) de plantas jovens de *Jatropha curcas* L., em função dos níveis de sombreamento testados.



(HIRAKI, 2011).

As concentrações de nitrato aplicadas influenciaram a atividade da GS nas folhas, assim como verificado aos 60 DAT, e nas raízes observou-se diferenças aos 30 e 90 DAT (Tabela 10). O comportamento da atividade da GS ajustou-se ao modelo regressão linear para as folhas, aumentando linearmente com o aumento das concentrações de nitrato aplicadas e quadrático para as raízes (Figura 17). Em experimento com seringueira (*H. brasiliensis*) Delú Filho et al. (1998) e Lemos et al. (1999) observaram que o nitrato exerceu um efeito positivo sobre a atividade dessa enzima, aumentando sua atividade em mais de cinco vezes nas lâminas foliares e também no sistema radicular. No presente trabalho, o nitrato aplicado aumentou em 1,5 vezes a atividade da GS nas lâminas foliares. Em plantas anuais a atividade da GS parece ser estimulada tanto pelo suprimento de nitrato (VÉZIMA; LANGLOIS, 1989 citado por DELÚ FILHO et al., 1998), como de amônio (HOEZLE et al., 1992 citado por DELÚ FILHO et al., 1998).

Figura 17- Atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) em folhas aos 60 dias após o início dos tratamentos (DAT) (a), e em raízes aos 30 (b) e 90 (c) DAT em plantas jovens de *Jatropha curcas* L. em função das concentrações de nitrato aplicadas.



(HIRAKI, 2011).

Com base nas regressões quadráticas obtidas para o comportamento da atividade da GS nas raízes de *J. curcas* (Figura 17), calculou-se as concentrações de nitrato onde a atividade desta enzima foi máxima, sendo de 25,7 mM aos 30 DAT e 25,8 mM aos 90 DAT. Concentrações essas muito próximas daquelas obtidas pelas regressões de atividades foliares da RN (Figura 11). Assim, há uma relação direta entre a atividade dessas duas enzimas, sendo que a GS, é totalmente dependente da atividade da RN quando somente fontes nítricas são utilizadas como fonte de nitrogênio. Lemos et al. (1999) observaram a mesma relação entre essas duas enzimas no tecido radicular de *H. brasiliensis* e sugeriram que a atividade da GS radicular seria dependente do NH_4^+ produzido nas raízes pela ação da RN.

As concentrações de amônia nos tecidos foliar e radicular aumentaram linearmente em função das concentrações de nitrato aplicadas (Figura 18), isso aconteceu provavelmente devido ao aumento da atividade da RN verificada também para este mesmo tratamento. Tal acúmulo de NH_4^+ parece ter favorecido a atividade da GS no tecido foliar, para a qual serve de substrato enzimático, uma vez que a atividade desta enzima no mesmo tecido também aumentou linearmente com o aumento das concentrações de nitrato aplicadas (Figura 17 a).

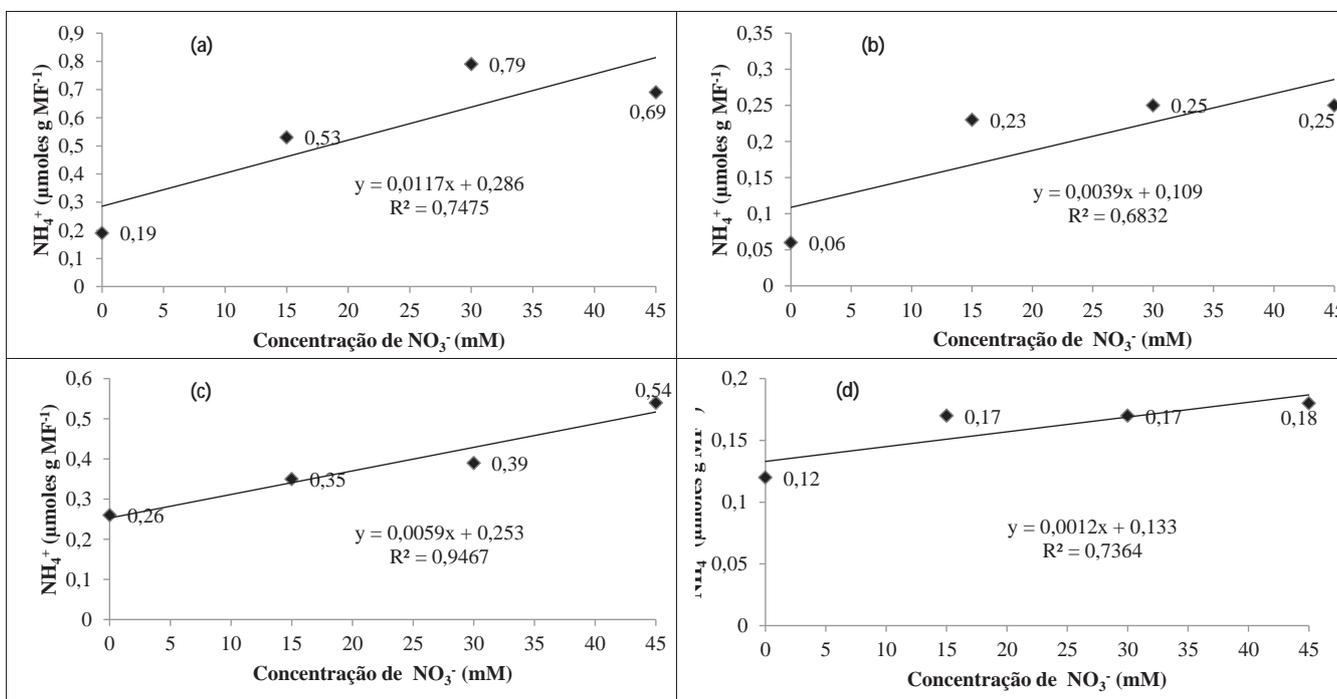
Apesar das equações de regressão apresentadas para as atividades das enzimas RN e GS mostrarem-se muito semelhantes tanto em folhas como em raízes de *J. curcas* com relação aos pontos de máximo obtidos, a análise de correlação linear não mostrou-se significativa, na maioria dos períodos analisadas para as atividades dessas duas enzimas nas folhas, com exceção aos 90 DAT onde houve uma fraca correlação negativa, que apesar de significativa, não pode ser considerada como um bom parâmetro devido ao baixo coeficiente obtido ($r=-0,1885$) (Tabela 12).

As correlações lineares entre as atividades das enzimas foram verificadas ao final do período experimental para as atividades da GS nas folhas e RN nas raízes ($r=0,2409$) e para as atividades da GS nas raízes e RN nas raízes ($r=0,3071$) (Tabela 13). Entretanto, devido ao baixo coeficiente de Pearson obtido essa relação, assim como reatado para as atividades foliares, não pode ser considerada como um bom parâmetro de avaliação e comparação.

Alguns autores destacaram a utilização das atividades das enzimas RN e GS para predição da produtividade em *C. arabica*, devido aos altos coeficientes de correlação obtidos entre essas variáveis (REIS; FURLANI JUNIOR; HAGA, 2007; REIS, et al. 2006). Neste trabalho, realizou-se análises de correlações lineares a fim de verificar se há comprovação entre as atividades das enzimas analisadas (RN e GS) com os parâmetros de massa analisados no primeiro capítulo para a espécie *J. curcas*. As correlações entre as atividades das enzimas

RN bem como para GS em folhas e raízes em relação à todos os parâmetros de crescimento vegetativo analisados, foram na maioria das correlações considerados não significativos em nível de 5% de probabilidade. Quando houveram resultados significativos, os coeficientes de correlação de Pearson obtidos foram muito baixos (valores com $r < 0,5$) (Tabelas 12 e 13), sendo considerados correlações fracas sob o ponto de vista estatístico, assim, as atividades das enzimas não podem ser utilizados como bons parâmetros para a predição em ganhos de massa em *J. curcas*.

Figura 18- Concentração de amônia (NH_4^+) em folhas aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) DAT e em raízes aos 120 DAT (d) de plantas jovens de *Jatropha curcas*, função das concentrações de nitrato aplicadas.



(HIRAKI, 2011).

Tabela 12- Correlações lineares entre altura, diâmetro do coleto, número de folhas, área foliar, atividade da redutase do nitrato no tecido foliar (RN), atividade da glutamina sintetase no tecido foliar (GS) e proteína total solúvel no tecido foliar, em plantas jovens de *Jatropha curcas* L., durante o período experimental. Ilha Solteira – SP, 2010.

	Altura	Diâmetro	nº de folhas	Pecíolo	Área	RN	GS	Proteína
30 DAT								
Altura	1,000							
Diâmetro	0,1763*	1,000						
nº de folhas	0,4373**	0,3587**	1,000					
RN	0,0255 ^{ns}	0,2602**	0,1866 ^{ns}			1,000		
GS	-0,134 ^{ns}	0,1819*	-0,0897 ^{ns}			-0,057 ^{ns}	1,000	
Proteína	0,0702 ^{ns}	0,3087**	0,2899**			0,369**	0,315**	1,000
60 DAT								
Altura	1,000							
Diâmetro	0,3603**	1,000						
nº de folhas	0,3598**	0,3858**	1,000					
Pecíolo	0,4241**	0,0496 ^{ns}	-0,1749*	1,000				
Área	0,4599**	0,0824*	-0,1172 ^{ns}	0,9377**	1,000			
RN	0,0998 ^{ns}	0,4402**	0,4206**	-0,1146 ^{ns}	-0,0818 ^{ns}	1,000		
GS	0,0259 ^{ns}	0,2569**	0,2689**	-0,452**	-0,352**	0,115 ^{ns}	1,000	
Proteína	0,0065 ^{ns}	0,0731 ^{ns}	0,2459**	-0,266**	-0,259**	0,150 ^{ns}	0,1775*	1,000
90 DAT								
Altura	1,000							
Diâmetro	-0,086 ^{ns}	1,000						
nº de folhas	0,5885**	-0,1662*	1,000					
Pecíolo	0,1793*	0,0476 ^{ns}	-0,2392**	1,000				
Área	0,2026*	0,0344 ^{ns}	-0,1994*	0,9564**	1,000			
RN	0,1855*	-0,038 ^{ns}	0,0984 ^{ns}	0,1219 ^{ns}	0,0917 ^{ns}	1,000		
GS	-0,073 ^{ns}	-0,054 ^{ns}	0,0962 ^{ns}	-0,279**	-0,229**	-0,1885*	1,000	
Proteína	0,0232 ^{ns}	-0,088 ^{ns}	0,2166**	-0,3536**	-0,2905**	0,008 ^{ns}	0,1404 ^{ns}	1,000
120 DAT								
Altura	1,000							
Diâmetro	0,4323**	1,000						
nº de folhas	0,4832**	0,2805**	1,000					
Pecíolo	0,5203**	0,2331**	0,2586**	1,000				
Área	0,2682**	0,2421**	0,1890 ^{ns}	0,2000*	1,000			
RN	0,3086**	0,2872**	0,0013 ^{ns}	0,1829*	0,1499	1,000		
GS	-0,0951 ^{ns}	0,111 ^{ns}	0,0168 ^{ns}	-0,3359**	-0,0802 ^{ns}	0,0154 ^{ns}	1,000	
Proteína	0,0987 ^{ns}	0,0816 ^{ns}	0,2480**	0,0029 ^{ns}	-0,0664 ^{ns}	0,0040 ^{ns}	0,3490**	1,000

Significativo pelo teste F * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, ^{ns} não significativo.

Tabela 13- Correlações entre comprimento da raiz principal (Raiz), massas fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), massas seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST), atividade da redutase do nitrato no tecido foliar (RN folhas) e nas raízes (RN raízes), atividade da glutamina sintetase no tecido foliar (GS folhas) e nas raízes (GS raízes), proteína solúvel nas folhas (Proteína F) e raízes (Proteína R) em plantas jovens de *Jatropha curcas* L. ao final do período experimental. Ilha Solteira – SP, 2010.

	Raiz	MFPA	MFR	MSPA	MSR	MST	RN folhas	GS folhas	Proteína F	RN raízes	GS raízes	Proteína R
Raiz	1,000											
MFPA	0,2013*	1,000										
MFR	0,1063 ^{ns}	0,8238**	1,000									
MSPA	0,1462 ^{ns}	0,9565**	0,8521**	1,000								
MSR	-0,0210 ^{ns}	0,7194**	0,9168**	0,7925**	1,000							
MST	0,0937 ^{ns}	0,9196**	0,9180**	0,9759**	0,907**	1,000						
RN folhas	0,0779 ^{ns}	0,3207**	0,2002*	0,3140**	0,159 ^{ns}	0,2744**	1,000					
GS folhas	-0,1468 ^{ns}	-0,0072 ^{ns}	0,1407 ^{ns}	0,0986 ^{ns}	0,276**	0,1671*	0,0154 ^{ns}	1,000				
Proteína F	-0,016 ^{ns}	0,1301 ^{ns}	0,0968 ^{ns}	0,1608 ^{ns}	0,131 ^{ns}	0,1583 ^{ns}	0,0040 ^{ns}	0,3490**	1,000			
RN raízes	-0,093 ^{ns}	0,0721 ^{ns}	0,1579 ^{ns}	0,1395 ^{ns}	0,2397*	0,1823*	0,0508 ^{ns}	0,2409**	0,0274 ^{ns}	1,000		
GS raízes	0,0257 ^{ns}	0,0987 ^{ns}	0,0579 ^{ns}	0,1058 ^{ns}	0,063 ^{ns}	0,0958 ^{ns}	0,1667*	-0,0022 ^{ns}	0,0317 ^{ns}	0,3071**	1,000	
Proteína R	-0,086 ^{ns}	-0,003 ^{ns}	-0,131 ^{ns}	-0,076 ^{ns}	-0,192*	-0,1217 ^{ns}	-0,0415 ^{ns}	-0,2256**	-0,0003 ^{ns}	-0,2934**	0,0072 ^{ns}	1,000

Significativo pelo teste F *p<0,05 e **p<0,01, ^{ns} não significativo.

Houve diferença nos teores de proteína total solúvel em folhas e raízes de *J. curcas* em função dos tratamentos efetuados. Com exceção aos 60 DAT onde ocorreu um decréscimo nas médias gerais dos teores de proteína total solúvel nos tecidos foliares, em todos os períodos analisados as médias nos teores de proteína mantiveram-se estáveis, variando de 2,1 a 2,8 mg gMF⁻¹ no tecido foliar e de 1,16 a 1,85 mg gMF⁻¹ no tecido radicular (Tabela 14). Assim como verificado em *H. brasiliensis* (LEMOS et al., 1999), nas folhas as médias de proteínas total solúvel são sempre superiores às médias obtidas nas raízes.

Tabela 14- Valores do teste F e média geral dos teores proteína total solúvel nos tecidos foliar e radicular em plantas jovens de *Jatropha curcas* L., aos 30, 60, 90 e 120 dias após o início dos tratamentos (DAT). Ilha Solteira – SP, 2010.

Tratamentos	30 DAT	60 DAT	90 DAT	120 DAT
F Sombreamento (%)				
0	3,42	1,06	3,94	3,39
30	2,74	0,84	3,09	1,89
50	2,05	0,48	2,16	1,72
70	2,08	0,54	1,98	1,49
O Concentrações (mM NO ₃ ⁻)				
L 0				
0	1,87	0,53	2,47	1,47
H 15				
15	2,21	0,61	2,88	2,07
A 30				
30	2,85	0,87	2,77	2,46
S 45				
45	3,35	0,91	3,05	2,52
Sombreamento (S)				
	11,84**	6,28**	11,19**	17,28**
Conc. Nitrato (N)				
	12,24**	2,93*	0,83 ^{ns}	5,47**
S*N				
	3,15**	2,60**	1,20 ^{ns}	1,18 ^{ns}
Média Geral (mg gMF⁻¹)				
	2,57	0,73	2,8	2,13
R Sombreamento (%)				
0	1,34	1,90	1,14	1,41
30	1,18	1,87	1,29	1,20
50	1,25	1,99	1,39	1,34
70	0,88	1,62	1,40	1,75
A Concentrações (mM NO ₃ ⁻)				
Í 0				
0	1,23	1,62	1,22	1,33
Z 15				
15	1,10	1,74	1,18	1,31
E 30				
30	1,12	2,04	1,39	1,39
S 45				
45	1,20	1,98	1,43	1,66
Sombreamento (S)				
	9,39**	5,28**	1,24 ^{ns}	6,49**
Conc. Nitrato (N)				
	0,86 ^{ns}	8,43**	1,28 ^{ns}	3,02*
S*N				
	2,13 ^{ns}	1,27 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,66 ^{ns}
Média Geral (mg gMF⁻¹)				
	1,16	1,85	1,30	1,42

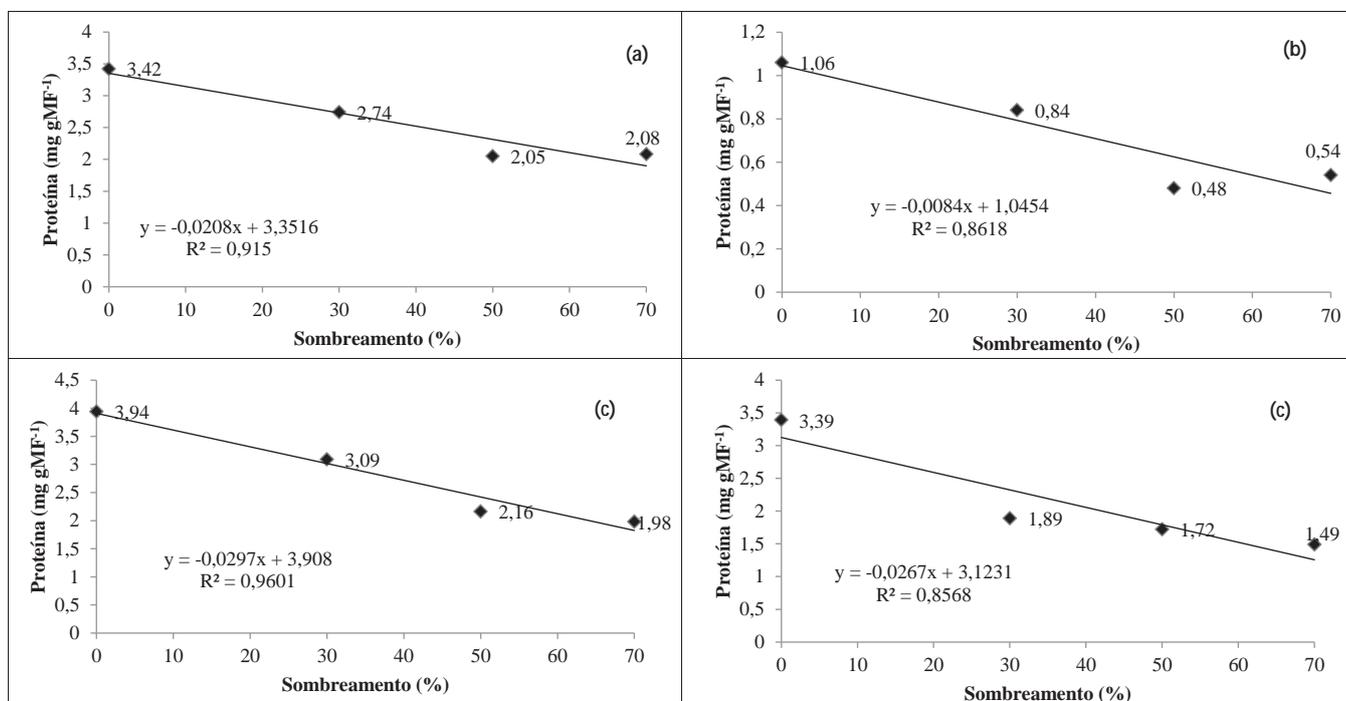
Significativo pelo teste F *p<0,05 e **p<0,01, ^{ns} não significativo.

Em cada um dos períodos analisados o aumento nos níveis de sombreamento proporcionaram diminuições lineares nos teores de proteína solúvel foliar (Figura 19) comportamento este acompanhado pelas atividades das enzimas RN e GS nos mesmos tecidos, demonstrando que há uma estreita relação entre a atividade dessas enzimas e a produção de proteínas nos tecidos, relação esta reforçada pelos resultados obtidos na análise de correlação linear (Tabela 12), na qual observou-se correlações positivas entre a atividade da RN e os teores de proteína no tecido foliar aos 30 DAT ($r=0,369$), bem como correlações positivas entre a atividade da GS e o teor de proteína em três dos quatro períodos analisados com coeficientes de Pearson (r) de 0,315; 0,1775 e 0,349, aos 30, 60 e 120 DAT, respectivamente. Já nas raízes os ajustes de regressão variaram conforme os períodos amostrados, sendo linear aos 30 e 120 DAT e quadrático aos 60 DAT (Figura 20).

De acordo com Carelli et al. (1996) a capacidade fotossintética das plantas é dependente do suprimento de nitrogênio. Uma considerável fração desse elemento encontra-se nas folhas, alocado nas proteínas envolvidas no processo fotossintético. Em adição, a fotossíntese depende de vários compostos nitrogenados, como enzimas e pigmentos fotossintéticos, para a produção dos compostos de carbono que compõem a parte aérea. Por essa razão, a capacidade fotossintética das plantas e o metabolismo do nitrogênio estão diretamente interligados.

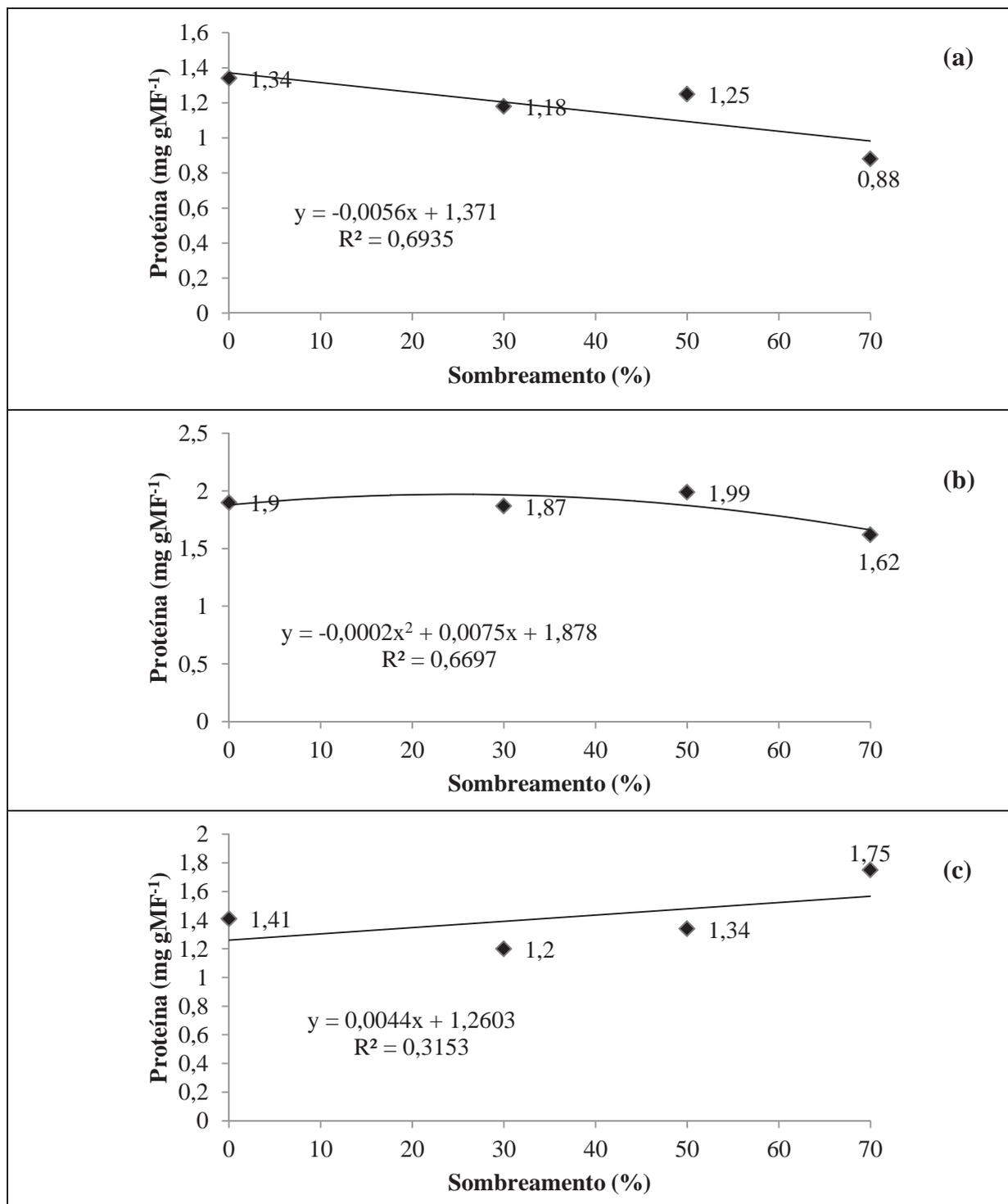
As concentrações de nitrato aplicadas influenciaram nos teores de proteína total solúvel em folhas e raízes de maneira linear (Figuras 21 e 22). O nitrogênio por participar da composição dos aminoácidos, desempenha um efeito direto sobre o conteúdo de proteína nos tecidos. O nitrogênio absorvido pelas plantas combina com cadeias carbônicas para a produção de aminoácidos, os quais resultam em proteínas que ficam armazenadas no tecido vegetal, aumentando os teores destas com a adubação nitrogenada.

Figura 19- Teores foliares de proteína total solúvel em plantas jovens de *Jatropha curcas* em função dos níveis de sombreamento testados aos 30 (a), 60 (b), 90 (c) e 120 (d) DAT.



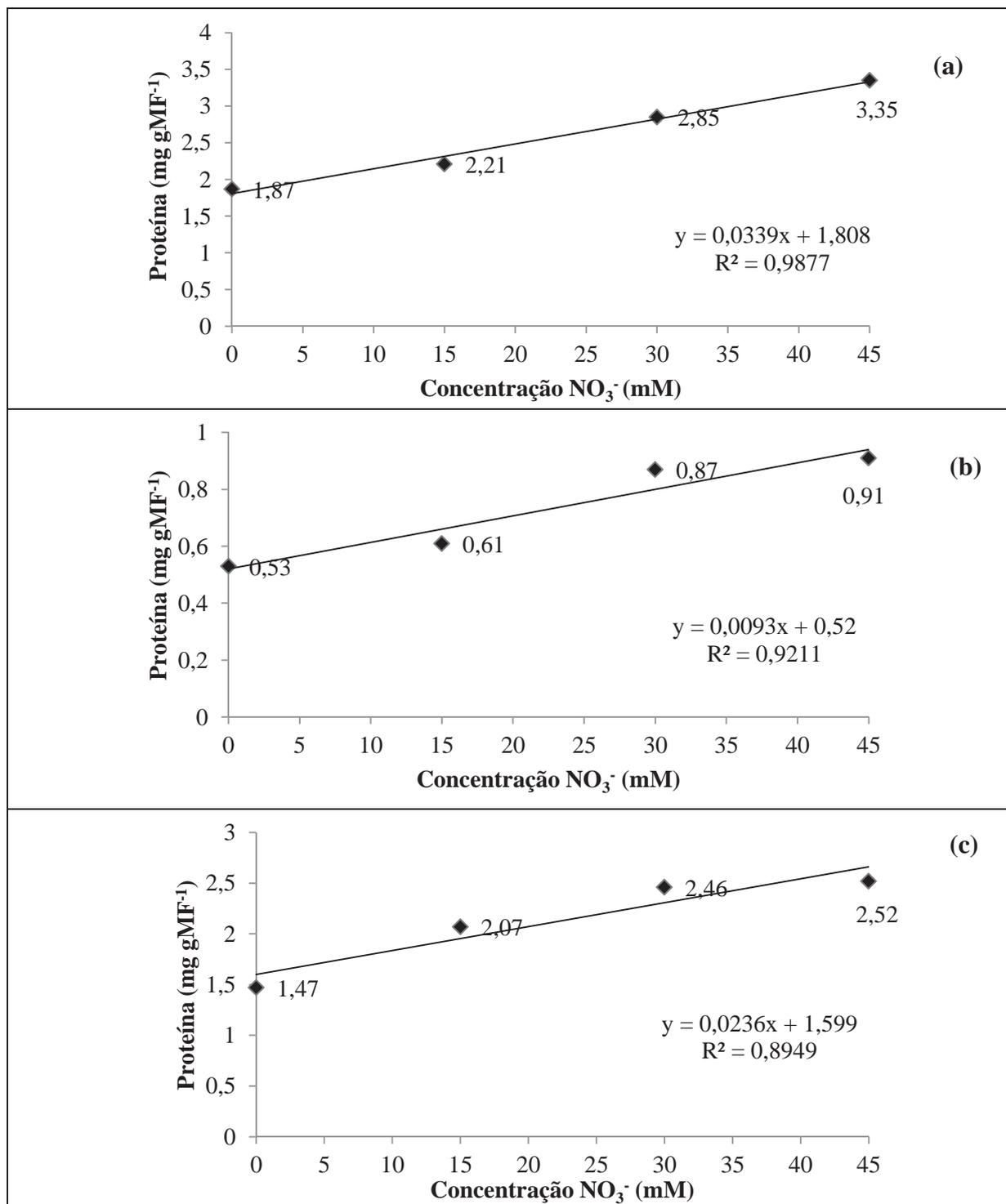
(HIRAKI, 2011).

Figura 20- Teores de proteína total solúvel em raízes de plantas jovens de *Jatropha. curcas* em função dos níveis de sombreamento testados, aos 30 (a), 60 (b) e 120 (c) DAT.



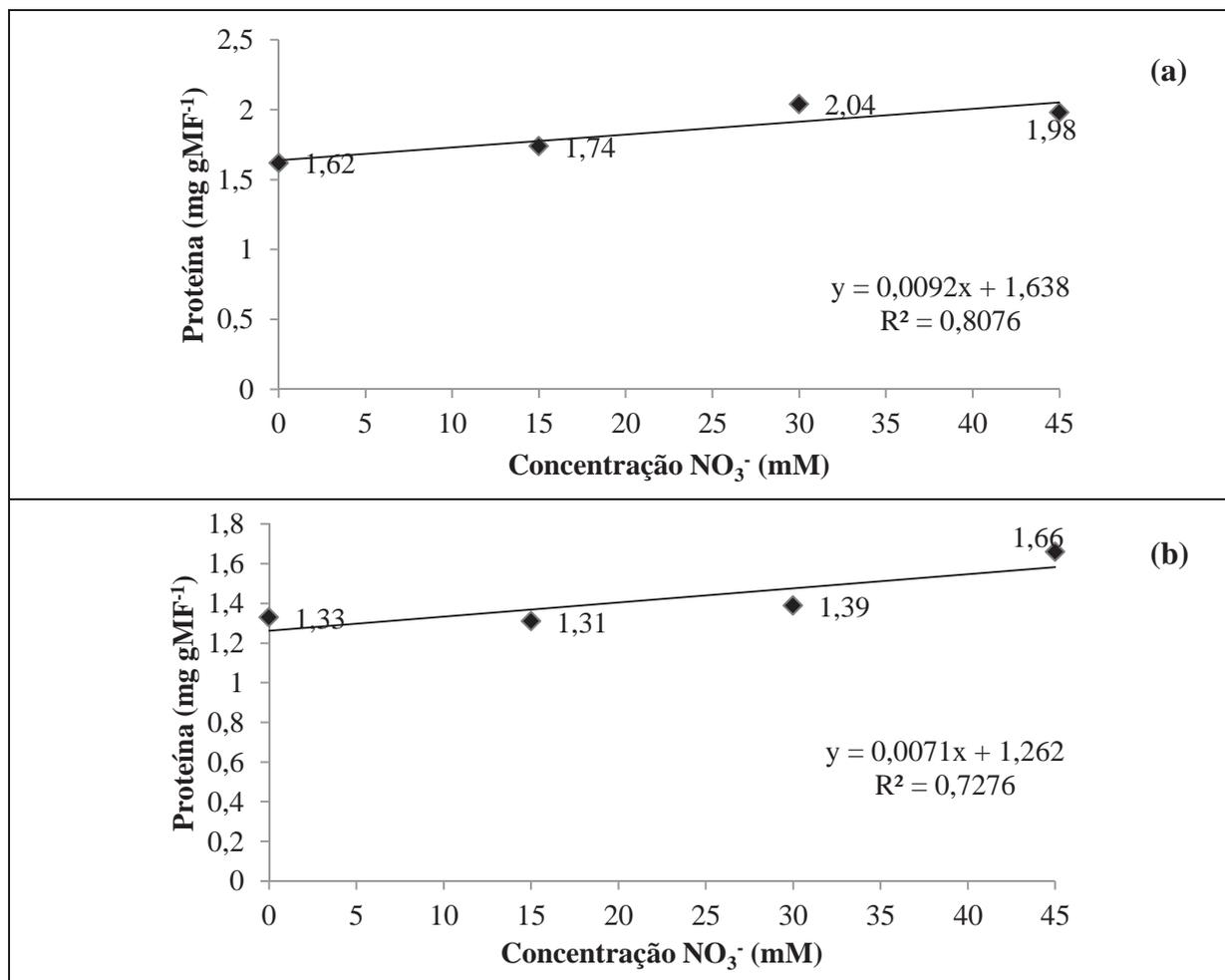
(HIRAKI, 2011).

Figura 21- Teores de proteína total solúvel em folhas de *Jatropha curcas* em função das concentrações de nitrato aplicadas, aos 30 (a), 60 (b) e 120 (c) DAT.



(HIRAKI, 2011).

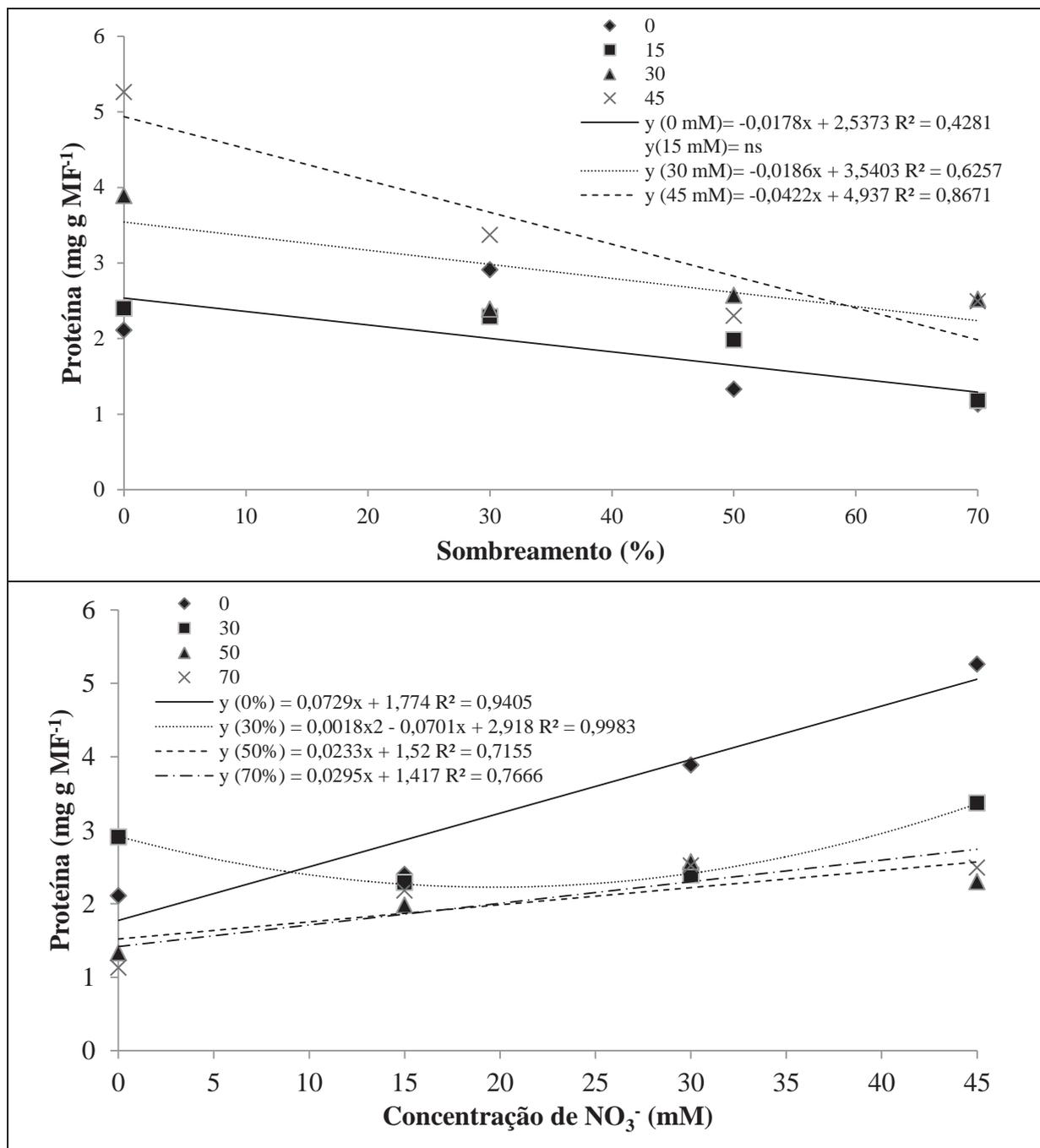
Figura 22- Teores de proteína total solúvel em raízes de *Jatropha curcas* em função das concentrações de nitrato aplicadas aos 60 (a) e 120 (b) DAT.



(HIRAKI, 2011).

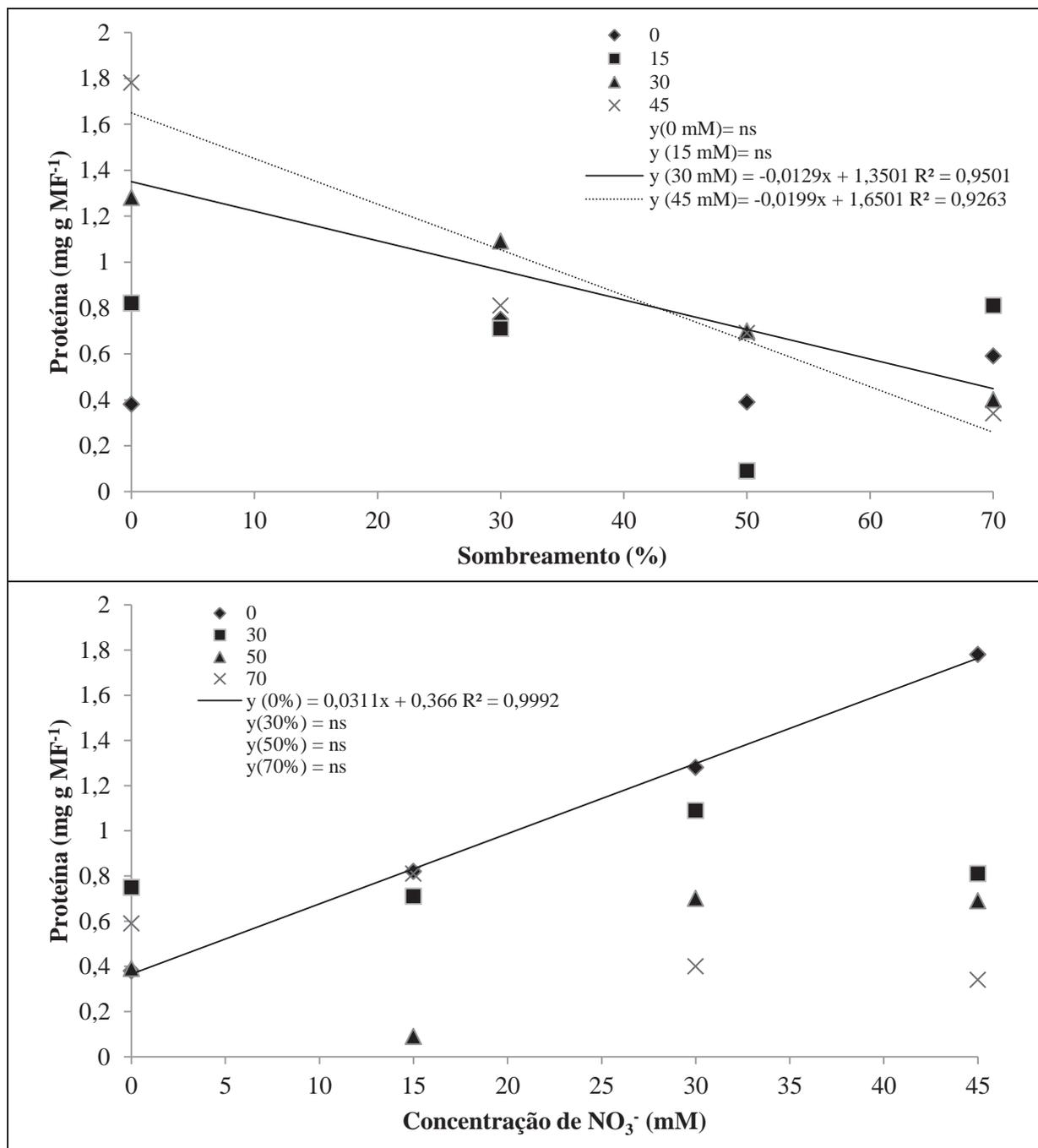
A análise dos desdobramentos das interações sombreamento X concentrações de nitrato demonstrou que independentemente da concentração aplicada, os teores de proteína diminuíram com a redução da luminosidade incidente e que o aumento nas concentrações de nitrato aplicado aumentaram o teor de proteína solúvel, sendo que na ausência de sombreamento, aliado à concentração máxima de nitrato aplicado obteve-se o maior índice de proteína no tecido foliar (Figuras 23 e 24).

Figura 23- Desdobramento da interação sombreamento X concentração de nitrato no tecido foliar aos 30 dias após o início dos tratamentos em plantas jovens de *Jatropha curcas* L.



(HIRAKI, 2011).

Figura 24- Desdobramento da interação sombreamento X concentração de nitrato no tecido foliar aos 60 dias após o início dos tratamentos em plantas jovens de *Jatropha curcas* L.



(HIRAKI, 2011).

6. CONCLUSÕES

As folhas são os sítios preferencias de redução de nitrato em *J. curcas*, com atividade média de no mínimo 10 vezes maior que a atividade das raízes. Elas são também os sítios preferenciais da fixação de nitrogênio via GS, a qual apresentou atividade média duas vezes superior ao tecido radicular.

As atividades das enzimas RN e GS, bem como o teor de proteínas solúveis, em folhas diminuiu com a elevação do sombreamento.

A concentração máxima de nitrato a ser aplicada em plantas jovens de *J. curcas* é de 30 mM, pois acima deste nível, as atividades das enzimas RN e GS, tanto em folhas como em raízes, sofreram redução, apresentando características de toxidez ao excesso de nitrato aplicado.

Há fracas correlações lineares entre os parâmetros de crescimento vegetativos analisados e as atividades das enzimas RN e GS, portanto a atividade dessas enzimas não podem ser utilizadas para predição do crescimento inicial de *J. curcas*.

A maior incidência luminosa aliada às maiores concentrações de nitrato propiciaram aumentos nos teores de proteína total solúvel em folhas e raízes de *J. curcas*.

7. REFERÊNCIAS

AYRES, M.; AYRES, JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 5. ed. Belém: Universidade Federal do Pará, 2007. 339 p.

BECKER, T. W.; CABOCHE, M.; CARRAYOL, E. HIREL, B.. Nucleotide-sequence of a tobacco c-DNA-encoding plastidic glutamine synthetase and light-inducibility organ specity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. **Plant molecular biology**, Belgium, v. 19, n. 3, p. 367-379, 1992.

BELTRÃO, N. E. M. **Considerações gerais sobre o pinhão manso (*Jatrofa curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras**. Campina Grande: EMBRAPA, 2006. 10 p.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical biochemistry*, Auckland - New Zealand, v.78, n. 17, p. 278-293, 1966.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. *Analytical biochemistry*, Athens - Georgia, v. 72, n. 1, p. 2, 1976.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure function and regulation bridging to gap between biochemistry and physiology. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, Dordrecht, v. 50, n. 1, p. 277-303, 1999.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I. Distribuição da assimilação de nitrato e de matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. *Bragantia*, Campinas, v. 50, n. 1, p. 29-37, 1991.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I.; MAGALHÃES, A.C. Redução de nitrato em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de luz e de nitrogênio. *Bragantia*, Campinas, v. 49, n. 1, p. 1-9, 1990.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, L. I. Partitioning of nitrate reductase activity in *Coffea arabica* L. and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes. *Braz. J. Plant Physiol.*, Campinas, v. 18, n. 3, p. 397-406, 2006.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, London, v.6, n. 1, p. 71-80, 1975.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D.; PURCINO, A. A. C. Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 10, n. 3, p. 185-190, 1998.

EDWARDS, J. W.; CORUZZI, G. M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *The plant cell*. New York, v. 1, n. 2, p. 241-248, 1989.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. São Paulo: Planta, 2006. 401 p.

FERREIRA, D. F. **Software sisvar versão 5.3**. Lavras: DEX/UFLA, 2000.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: USP, 2000. 477p.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.** - Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. / International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 66 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California Agricultural Experimental Station, 1938. 39 p.

KAISER, W. M.; WEINER, H.; HUBER, S. C. Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction of environmental stimuli into control catalytic activity. **Physiologia Plantarum**, John Wiley, v. 105,n. 2, p. 385-390, 1999.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Pos-translation regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 363, n. 52, p. 1981-1989, 2001.

LEMOS, G. B. DE; DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M. DE; PURCINO, A. A. C. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 11, p. 113-118, 1999.

MACHADO. A. T.; SODEK, L.; PATERNIANI, E.; FERNANDES, M.S. Nitrate reductase and glutamine synthetase activities in S1 endogamic families of the maize populations sol da manhã nf and catetão. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 88-102, 2001.

McCULLOUGH, H. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Elsevier, v.17, n. 2, p. 287-304, 1967.

MIFLIN, B. J.; WALLSGROVE, R. M.; LEA, P. J. Glutamine metabolism in higher plants. **Current topics cellular regulation**, Bethesda, v. 2, n. 1, p. 1-43, 1981.

OLIVEIRA, M. A. J. de; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; RODRIGUES, J. D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, mai-jun, 2005.

PEIXOTO, A. R. Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo: Nobel, 1973. 282 p.

PEREIRA-NETO, A. B.; MAGALHÃES, A. C. M.; PINTO, H. S. Atividade da redutase de nitrato em Kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*): Padronização das condições de ensaio. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, Londrina, n.1, v.2, p. 133-137, 1989.

PUJAD-RENAUD, V.; CLEMENT, A.; PERROT-RECHENMANN, C. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. **Plant physiology**, Washington, v. 105, n. 1, p. 127-132, may, 1994.

RADIN, J. W. *In vivo* assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. **Plant physiology**, Washington, v. 51, p. 332-336, 1973.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 163-171, 2006.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão manso (*Jatrofa curcas* L.). **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SCHEIBLE, W. R.; GONZÁLES-FONTES, A.; LAUERER, M., MULLER-ROBER, B., CABOCHE, M., STITT, M. Nitrate acts as a signal to introduce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The plant cell**, New York, v. 9, n. 5, p. 783-798, 1997.

SILVEIRA, J. A. G.; MATOS, J. C. S.; CECATTO, V. M.; VIEGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. **Environmental and Experimental Botany**, Netherlands, v., 46, p. 37-46, 2001.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.98.

STITT, M. Fructose-2, 6-biphosphate and carbohydrate metabolism. **Plant physiology**, Washington, v. 84, n. 2, p. 202-204, 1987.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TJADEN, G.; EDWARDS, J. W.; CORUZZI, G. M. *Cis* elements and *trans*-acting factors affecting regulation of a non-photosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant physiology**, Washington, v. 108, n. 3, p. 1109-1117, 1995.

VIANA, E. M. **Interação de nitrogênio e potássio na nutrição, no teor de clorofila e na atividade da redutase do nitrato em plantas de trigo.** 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em agronomia)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.