



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Ilha Solteira

FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

MATEUS VENDRAMINI RAMPAZZO

PAPEL FISIOLÓGICO DO NÍQUEL NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO
E ANTIOXIDANTE EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR

ILHA SOLTEIRA
2022

MATEUS VENDRAMINI RAMPAZZO

**PAPEL FISIOLÓGICO DO NÍQUEL NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO
E ANTIOXIDANTE EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Engenharia do Campus de Ilha
Solteira – UNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Enes Furlani
Júnior

ILHA SOLTEIRA
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

R177p Rampazzo, Mateus Vendramini.
Papel fisiológico do níquel no metabolismo do nitrogênio e antioxidante em variedades de cana-de-açúcar / Mateus Vendramini Rampazzo. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
45 f. : il.

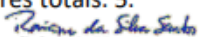
Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2023

Orientador: André Rodrigues dos Reis

Coorientador: Enes Furlani Junior

Inclui bibliografia

1. Redutase do nitrato. 2. Urease. 3. Aminoácidos. 4. Açúcares totais. 5. Saccharum officinarum.


Raiane da Silva Santos
Supervisora Técnica do Setor
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
CIBIS - 9999

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
CURSO DE ENGENHARIA AGRÔNOMICA

ATA DA DEFESA - TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: PAPEL FISIOLÓGICO DO NÍQUEL NO METABOLISMO DO
NITROGÊNIO E ANTIOXIDANTE EM VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR.

ALUNO: MATEUS VENDRAMINI RAMPAZZO

ORIENTADOR: PROF. DR. ENES FURLANI JUNIOR

Aprovado (X) - Reprovado () pela Comissão Examinadora. Nota: 10,00

Comissão Examinadora:



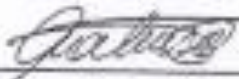
PROF. DR. ENES FURLANI JUNIOR



PROF. DR. AMANDA PEREIRA PAIXÃO DARUICHI



PROF. MSC. MATHEUS PEREIRA DE BRITO MATEUS



ALUNO: MATEUS VENDRAMINI RAMPAZZO

Ilha Solteira(SP) 23 de fevereiro de 2023.

Dedicatória

Ao meu pai, José Eduardo

À minha mãe, Sandra

À minha irmã, Ana Clara

Aos meus avós, Zemiro, Odilma, Orides e Iolanda

Aos meus colegas de casa, República Bola Azul

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de dedicar esse trabalho ao meu pai, José Eduardo (in memoriam), por toda amizade, por ter sido um exemplo em vida e por não ter medido esforços para que eu e minha irmã pudéssemos ir atrás dos nossos sonhos. Também dedico a minha mãe, Sandra, que é um exemplo de força e perseverança e sem seus esforços nunca teria chegado a onde cheguei.

À minha irmã Ana Clara por me motivar a sempre persistir.

Aos meus avós Zemiro, Odilma, Orides (in memoriam) e Iolanda, por sempre me motivarem e me apoiarem incondicionalmente.

A todos meus familiares por sempre estarem dispostos a me ajudar, sempre que precisei.

Aos meus amigos da república Bola Azul, em especial: Renan Ranzani, Murilo Rodrigues, Nathan Voltarelli, Renan Izeli, Felipe Sandrini Nogarol, Alexandre Matheus Rosa, Maurício Barco Neto, Vitor Fernandes Perroni, Bruno Mori, Bruno Ricarte, Lucas Leite Alves, Marcos Vinicius Rodrigues Knoll, Mateus Ferreira Kitagawa, Lucas de Souza Oliveira, Nicolas Andrade Bragante, Jefferson De Lazzari, Alfredo Van Rooijen, Alexandre Toniato, Vitor Barbosa, Vitor Pereira, pelos anos, aprendizados, risadas e momentos compartilhados.

À minha namorada Mariana por me apoiar e me incentivar sempre a melhorar.

Ao meu orientador, André, pelo auxílio em todas as minhas dúvidas e necessidades e por ser um profissional dedicado e exemplo a ser seguido.

Ao Grupo de Estudo em Fisiologia Agrícola (GEFA), em especial: Matheus Cunha, Maria Gabriela Lanza, Márcio Silva, Matheus Mateus, por toda disponibilidade e ajuda para conclusão desse trabalho.

A todos da UNESP Ilha Solteira por todos os anos incríveis que passei na Universidade e que guardei para sempre comigo.

*“A educação tem raízes amargas,
mas os seus frutos são doces.”*

(Aristóteles)

RESUMO

A cultura da cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) é de extrema relevância para a economia brasileira. O metabolismo do nitrogênio (N) é fundamental para cultura da cana-de-açúcar, pois é através da absorção do nitrogênio que são formadas proteínas que participam dos processos metabólicos nas células, desempenhando papel funcional e estrutural para o crescimento da planta. O níquel (Ni) é cofator da urease e atua ativamente no metabolismo do nitrogênio e antioxidante das plantas. O projeto foi conduzido em esquema fatorial duplo sendo duas variedades de cana-de-açúcar (RB 86 7515 e RB 96 6928) e seis doses de Ni (0; 0,25; 0,5; 1; 3; 9 mg kg⁻¹) com quatro repetições, totalizando 48 vasos. A aplicação de Ni foi benéfica para as plantas de cana-de-açúcar por proporcionar aumento nos pigmentos fotossintéticos na variedade RB 966928 em todas as aplicações de Ni, enquanto que, para a variedade RB 867515 a dose de 1 mg kg⁻¹ foi a que melhor apresentou resultados. A aplicação de Ni também estimulou o aumento da concentração da urease e da redutase do nitrato para a variedade RB 867515 conforme aumentou-se as doses. Enquanto que, para a variedade RB 966928 houve maior concentração de urease e redutase do nitrato nas doses 0,25 e 3,0 mg kg⁻¹, respectivamente. A aplicação de Ni favoreceu positivamente o metabolismo do nitrogênio para as duas variedades, mais especialmente para a variedade RB 966928. Nota-se uma maior concentração de amônia na dose controle e um decaimento expressivo até a dose máxima, em consequência, percebe-se uma progressão na concentração de aminoácidos e de açúcares totais. Para o metabolismo antioxidante, a aplicação de Ni também se mostrou favorável. Nota-se que para as duas variedades quanto maior a dose de Ni, menor a concentração de H₂O₂. A variedade RB 966928 apresentou melhores concentrações de SOD e APX na dose de 0,25 mg kg⁻¹ e para CAT na dose de 9,0 mg kg⁻¹. Para a variedade RB 867515, a CAT apresentou melhores resultados na dose 1,0 mg kg⁻¹, enquanto que a SOD e a APX apresentaram na dose 0,5 mg kg⁻¹. A aplicação de Ni também apresentou aumento na produtividade na dose de 0,5 mg kg⁻¹ para as duas variedades.

Palavras-chave: Redutase do nitrato; urease; aminoácidos; açúcares totais; *Saccharum officinarum*

ABSTRACT

The cultivation of sugarcane (*Saccharum officinarum*) is extremely important for the Brazilian economy. Nitrogen (N) metabolism is essential for sugarcane cultivation, as it is through nitrogen absorption that proteins are formed that participate in metabolic processes in cells, playing a functional and structural role for plant growth. Nickel (Ni) is a urease cofactor and plays an active role in the nitrogen and antioxidant metabolism of plants. The project was carried out in a double factorial scheme, with two sugarcane varieties (RB 86 7515 and RB 96 6928) and six doses of Ni (0; 0.25; 0.5; 1; 3; 9 mg kg⁻¹) with four replications, totaling 48 pots. Ni application was beneficial for sugarcane plants by providing an increase in photosynthetic pigments in the RB 966928 variety in all Ni applications, while for the RB 867515 variety the dose of 1 mg kg⁻¹ was the that presented the best results. The application of Ni also stimulated an increase in the concentration of urease and nitrate reductase for the variety RB 867515 as the doses increased. While for the variety RB 966928 there was a higher concentration of urease and nitrate reductase at doses of 0.25 and 3.0 mg kg⁻¹, respectively. The application of Ni positively favored nitrogen metabolism for both varieties, more especially for the RB 966928 variety. A higher concentration of ammonia in the control dose and an expressive decay up to the maximum dose can be observed, as a result, a greater concentration of ammonia is observed. progression in the concentration of amino acids and total sugars. For antioxidant metabolism, the application of Ni was also favorable. Note that for both varieties, the higher the Ni dose, the lower the H₂O₂ concentration. The variety RB 966928 showed better concentrations of SOD and APX at the dose of 0.25 mg kg⁻¹ and for CAT at the dose of 9.0 mg kg⁻¹. For the RB 867515 variety, CAT showed better results at 1.0 mg kg⁻¹, while SOD and APX showed better results at 0.5 mg kg⁻¹. Ni application also showed an increase in productivity at a dose of 0.5 mg kg⁻¹ for both varieties.

Keywords: Nitrate reductase; urease; amino acids; total sugars; *Saccharum officinarum*.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Atributos químicos do solo utilizado para realização do experimento..... **Erro!**

Indicador não definido.

Tabela 2 - Concentração de elementos em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar em resposta a doses de Ni..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3 - Concentração de elementos em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar em resposta a doses de Ni.....31

Lista de Figuras

- Figura 1** - Ciclo da ornitina, poliaminas e rota da biossíntese de ureia na planta. Os números representam as enzimas responsáveis pela rota identificada em *Arabidopsis thaliana*.....14
- Figura 2** - Mecanismo hipotético proposto sobre o efeito do Ni no metabolismo do N e antioxidantes em plantas de cana-de-açúcar.....16
- Figura 3** - Mudas de cana-de-açúcar pré-brotadas **Erro! Indicador não definido.**8
- Figura 4** - Mudas de cana-de-açúcar transplantadas no vaso com adubação de plantio ... **Erro! Indicador não definido.**9
- Figura 5** - Coleta e maceração de folha diagnose para extração de enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, concentração de peróxido de hidrogênio, análise de compostos nitrogenados (nitrato, amônia, aminoácidos) e açúcares (sacarose e açúcares totais).....20
- Figura 6** - Efeitos da aplicação de doses de Ni na concentração de clorofila A (a), clorofila B (b), clorofila total (c), carotenoides (d), feofitina A (e) e feofitina total (f) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$..**Erro! Indicador não definido.**27
- Figura 7** - Efeitos da aplicação de Ni na atividade da urease (a) e redutase do nitrato (b) em variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$..**Erro! Indicador não definido.**29
- Figura 8** - Efeitos da aplicação de Ni na concentração de nitrato (a), amônia (b), açúcares totais (c) e aminoácidos (d) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$ 30**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9** - Efeitos da aplicação de Ni na concentração de H_2O_2 (a), MDA (b), SOD (c), CAT (d), APX (e) e proteína (f) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das

doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$ **Erro! Indicador não definido.**32

Figura 10 - Efeitos da aplicação de Ni na concentração de massa seca da raiz (a), massa seca das folhas (b), número de perfilhos (c), altura (d), massa seca de colmos (e) e produtividade (f) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$**Erro! Indicador não definido.**4

Figura 11 - Correlação linear de Pearson das variáveis de variedades de cana submetida aplicação de doses de Ni. Espaços em branco indica não significância entre as variáveis a $p > 0.05$ 35

Figura 12 - Efeitos da aplicação de Ni na concentração de Ni em folhas de duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$**Erro! Indicador não definido.**

INDICE

Dedicatória	2
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1. Descrição da área experimental	19
2.2. Instalação e condução do experimento.....	19
2.3. Variáveis Analisadas	21
2.3.1 Análises biométricas em campo	21
2.3.2. Análises bioquímicas de folhas.....	22
➤ 2.3.2.1. Extração de compostos nitrogenados para análise e quantificação	22
➤ 2.3.2.1.1. Determinação de Nitrato	23
➤ 2.3.2.1.2. Determinação de Amônia	23
➤ 2.3.2.1.3. Determinação de Aminoácidos totais	23
➤ 2.3.2.2. Determinação de carboidratos	23
➤ 2.3.2.2.1. Determinação de açúcares solúveis totais	24
➤ 2.3.2.2.2. Determinação de sacarose	24
➤ 2.3.2.3. Determinação de pigmentos fotossintéticos	24
➤ 2.3.2.4. Determinação do metabolismo antioxidante.....	24
➤ 2.3.2.4.1. Determinação de proteínas totais.....	25
➤ 2.3.2.4.2. Atividade de superóxido dismutase (SOD, EC: 1.151.1).....	25
➤ 2.3.2.4.3. Atividade da Catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)	25
➤ 2.3.2.4.4. Atividade de Ascorbato peroxidase (APX, EC: 1.11.1.11).....	25
➤ 2.3.2.5. Determinação do estresse oxidativo	26
➤ 2.3.2.5.1. Conteúdo de Peroxido de Hidrogênio.....	26
➤ 2.3.2.5.2. Peroxidação lipídica – Malondialdeído (MDA)	26
➤ 2.3.2.6. Determinação da atividade da uréase.....	26
➤ 2.3.2.7. Determinação da atividade da redutase do nitrato	27
➤ 2.3.2.8. Análises nutricionais	28
➤ 2.4. Análise estatística	28

4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das principais culturas do PIB agropecuário nacional, bem como o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, logo, o maior produtor e exportador de açúcar e um dos maiores em combustíveis renováveis oriundos dessa cultura. (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2022).

Visando vencer as adversidades climáticas e aumentar a produtividade dos canaviais para atender mercado externo e interno em expansão, o setor sucroalcooleiro brasileiro conta com instituições de muita credibilidade que trazem inovações setoriais. Algumas dessas instituições são Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), entre outras. Estas instituições foram responsáveis pelos principais avanços no desenvolvimento de variedades e biotecnologias para o setor (CARVALHO, 2013).

Penatti (2013), afirma que o nitrogênio tem a função de promover o alongamento dos entrenós da cana, favorecendo o seu desenvolvimento e melhorando a produtividade, além disso, o nitrogênio é o quarto elemento encontrado em maior concentração na cana-de-açúcar, atrás apenas de carbono, hidrogênio e oxigênio. Para a cultura da cana-de-açúcar, o N é importante para a nutrição e fisiologia da planta, já que, dentre suas funções consistem na constituição das proteínas e dos ácidos nucleicos (MALAVOLTA et al., 1997), juntamente das moléculas de clorofila, sendo este um dos principais fatores para o incremento da produção, haja vista que o N atua na expansão da área foliar e, conseqüentemente, aumenta a captação de radiação fotossintética, bem como seu uso eficiente, na produção de biomassa (SINCLAIR E HOREI, 1989), no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da cana (SILVA, 2012). Um dos problemas mais relevantes na produção de cana-de-açúcar é com a adubação nitrogenada, pelo fato da cultura ter baixa recuperação de N (entre 10 a 40%) (HARTEMINK, 2008). No plantio de cana planta, a adubação nitrogenada não tem muita significância, diferencialmente do que acontece com a cana-soca, na qual as respostas tem percentual acima de 90% (OLIVEIRA et al., 2007), uma vez que as condições são mais favoráveis ao aproveitamento de N pela planta devido às altas produtividades anteriores (PENATTI, 2013). Para Vitti e Trivelin (2012) a elevada quantidade de palha deixada sobre o solo, imobiliza parte do N, justificando a aplicação de N mineral em soqueira. As principais respostas estão na maior produção de colmos e no acréscimo do rendimento de tonelada de cana por hectare (TCH).

Os radicais livres, formados nos processos de fotossíntese e respiratório, cumprem funções biológicas importantes. Quando produzidos em quantidades adequadas, culminam na produção de energia (ATP). No entanto, a produção contínua de radicais livres aumenta a peroxidação lipídica da membrana celular o que culmina na senescência foliar acelerada (BARBOSA, 2010). Para bloquear esse efeito tóxico dos radicais livres, entra em ação um conjunto heterogêneo de substâncias, o metabolismo antioxidante (OU et al., 2002). As espécies reativas de oxigênio demonstram induzir a peroxidação lipídica de membranas celulares, resultando no processo de senescência da planta (DEUNER et al., 2011). A medida a ser tomada pelas plantas, para retardar a senescência acelerada é a ativação das enzimas oxidativas como catalase, a ascorbato peroxidase e a guaiacol peroxidase são enzimas que catalisam a conversão do H_2O_2 em água e O_2 (GRATÃO et al., 2005). Dessa forma, com o retardo da senescência, aumenta-se a capacidade da planta em realizar a fotossíntese e seus fotoassimilados acompanham a força do dreno (Taiz & Zeiger, 1998) aumentando-se a capacidade de armazenar sacarose (CAPUTO, 2007). Esse processo de aumento de sacarose, via metabolismo antioxidante é perceptível, pois segundo GANDUL-ROJAS et. al., 2004, no metabolismo oxidado, formam-se as hidroxilclorofilas, juntamente com as clorofilases, que são enzimas que degradam as clorofilas, impedindo as mesmas, de realizarem sua função.

A essencialidade do níquel (Ni) foi provada por Dixon et al. (1975) ao constatar que o metal é constituinte da metaloenzima urease (EC 3.5.1.5., ureia amidohidrolase), a qual catalisa a hidrólise da ureia em amônia (NH_4^+) e dióxido de carbono (CO_2).

Segundo Reis (2014) o Ni participa ativamente no metabolismo do N. Estudos afirmam que o Ni aumenta a concentração de clorofilas (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2012; RODAK, 2014), aumento da taxa fotossintética (RODAK, 2014), alteração na atividade da enzima redutase do nitrato (REIS et al., 2014), atraso da senescência e inibição da produção de etileno (SMITH; WOODBURN, 1984), alteração da atividade da enzima ACC oxidase (ZHENG et al., 2006). O Ni também exerce interferência no metabolismo de aminoácidos e de ácidos orgânicos (WALKER et al., 1985; BROWN; WELCH; MADISON, 1990; BAI; REILLY; WOOD, 2006;), na germinação das sementes (BROWN; WELCH; CARY, 1987) e no catabolismo de ureídeos.

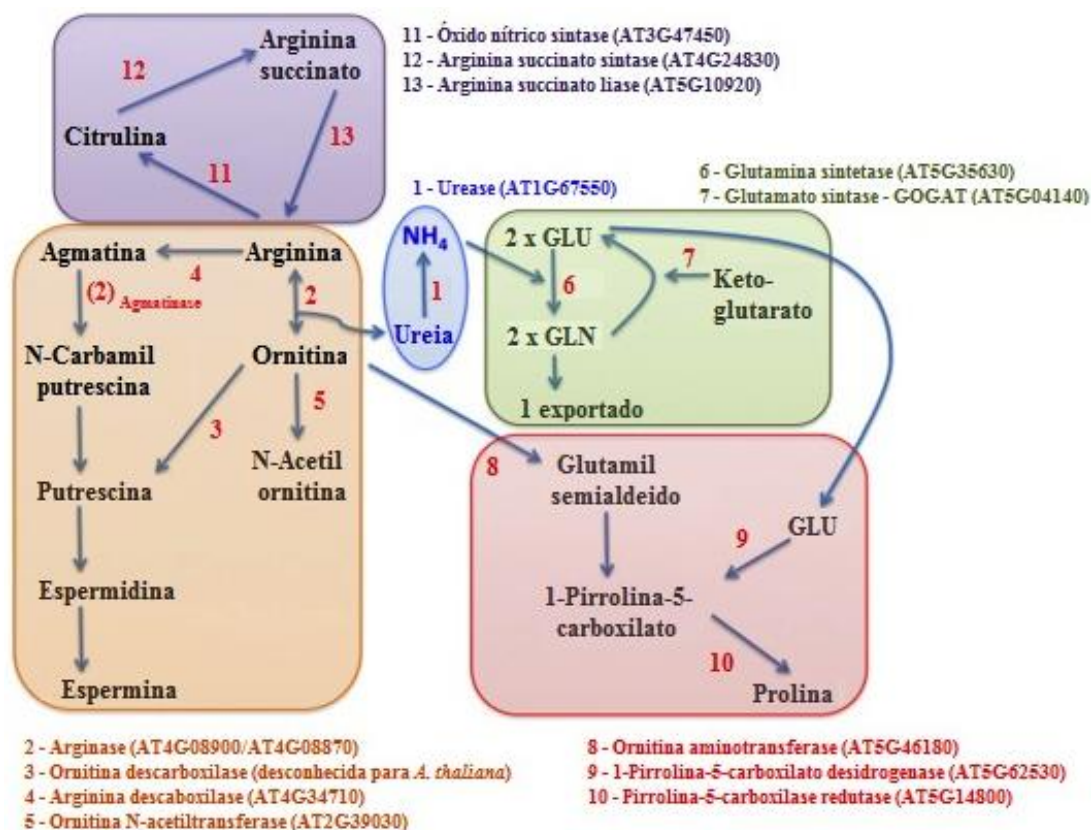


Figura 1. Ciclo da ornitina, poliaminas e rota da biossíntese de ureia na planta. Os números representam as enzimas responsáveis pela rota identificada em *Arabidopsis thaliana*. Fonte: Adaptado de Polacco et al. (2013).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A absorção de Ni pelas plantas e efeitos fisiológicos

O Ni é absorvido pelas plantas preferencialmente como cátion divalente (Ni^{2+}), também sendo absorvido na forma de quelatos com compostos orgânicos e metalóforos. Após entrar em contato com o sistema radicular, o Ni é absorvido, principalmente, por processo ativo, em canais não específicos, bem como por difusão passiva (YUSUF et al., 2011). A forma e o processo de absorção predominante dependem dos teores de Ni no solo e, sobretudo, do efeito do pH sobre sua disponibilidade e realmente, dos fatores que mais afetam o comportamento do Ni, no solo, o pH é o principal, pois estes são grandezas inversamente proporcionais, como comprovado no trabalho de Siebielec e Chaney (2006), que afirmou à redução de Ni (maior adsorção), com o aumento do pH, com redução drástica da sua disponibilidade em pH superior

a 6,5. Outros fatores relacionados a disponibilidade do Ni no solo são: classe textural do solo, pois teores de argila se relacionam positivamente com os de Ni, enquanto que com a areia, se relacionam negativamente, isso tudo se deve ao fato que, as partículas de argilas contêm maior quantidade de cargas negativas em sua superfície, ou seja, maior CTC (BETTINELLI et al., 2000; SENWO e TAZISONG, 2004; CARIDAD-CANCELA; PAZ-GONZÁLEZ; ABREU, 2005; RAJAIE et al., 2008). Desse modo, o Ni tem baixa mobilidade e disponibilidade, já que se encontra no solo de forma mineral.

Após a absorção, o Ni é transportado no xilema na forma iônica, em decorrência da transpiração das plantas, sendo o transporte facilitado com a formação de quelatos com ácidos orgânicos, tais como citrato, malato e peptídeos (WHITE, 2012), bem como com aminoácidos, com destaque para a histidina (KRAMER et al., 1996), resultando em maior mobilidade do elemento no xilema (WHITE, 2012).

Simultaneamente a isso, a planta vai realizando a síntese de ureia ($\text{CO}_2[\text{NH}_2]_2$), pelo ciclo da ornitina, catalisado pela enzima arginase, presente em todas as plantas superiores (WALKER et al., 1985). E posteriormente a isso, a urease, desdobra a ureia hidroliticamente em duas moléculas de amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2) no tecido vegetal (Eskew et al., 1983; DIXON et al. 1975). A principal função da urease é permitir aos organismos o uso da ureia formada interna ou externamente como fonte de N (MOBLEY e HAUSINGER, 1989; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995; ANDREWS; BLAKELEY; ZERNER, 1984; TEZOTTO et al., 2012). Quando sua atividade é baixa, devida a indisponibilidade de Ni, a ureia se concentra a níveis consideráveis, podendo levar eventualmente a alterações nos compostos intermediários do ciclo da ornitina (GERENDÁS e SATTERLMACHER, 1997). Foi relatado ainda pelos autores que, com o aumento significativo de Ni, aumentou-se a atividade da urease em diversas espécies e sua deficiência afetou o metabolismo dos aminoácidos em feijão-caupi (WALKER, et al., 1985), diminuiu a atividade da urease, fomentou a deficiência do metabolismo do N e afetou os aminoácidos (glicina, asparagina, arginina, ornitina e citrulina) em diversas espécies.

Para González et al., (2015), baixas doses de Ni pulverizada nas folhas das plantas, culminaram numa maior tolerância ao estresse biótico e abiótico, uma vez que esse micronutriente gera respostas de defesa no metabolismo antioxidante, pois ele aumenta a atividade de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, como por exemplo, a catalase (CAT),

peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), que protegem as células vegetais contra os radicais livres (SCALABRIN; RADAELLI; CAPODAGLIO, 2016).

Efeitos fisiológicos semelhantes são encontrados em função da aplicação de Ni nas culturas, como aumento no conteúdo de clorofila (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2012; RODAK, 2014), aumento da taxa fotossintética (RODAK, 2014), alteração na atividade da enzima redutase do nitrato (REIS et al., 2014), atraso da senescência e inibição da produção de etileno (SMITH; WOODBURN, 1984), alteração da atividade da enzima ACC oxidase (ZHENG et al., 2006). O Ni também exerce interferência no metabolismo de aminoácidos e de ácidos orgânicos (WALKER et al., 1985; BROWN; WELCH; MADISON, 1990; BAI; REILLY; WOOD, 2006).

Uma quantidade significativa do fluxo do nitrogênio se dá através da ureia (47% N), o qual é reciclado somente pela ação da enzima urease (POLACCO; HOLLAND, 1993), o que justifica sua influência no aumento da produtividade (MORAES et al., 2010), taxas de crescimento (LEVY, 2013), e na produção de massa seca das culturas (MALAVOLTA; MORAES, 2007).

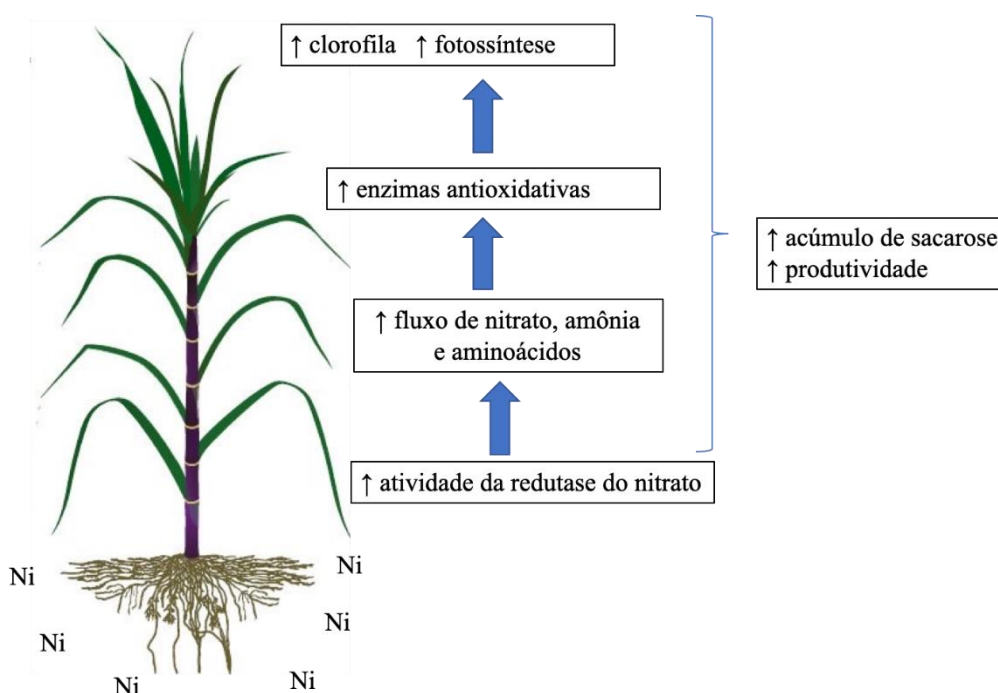


Figura 2. Mecanismo hipotético proposto sobre o efeito do Ni no metabolismo do N e antioxidantes em plantas de cana-de-açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Descrição da área experimental

O experimento foi realizado em vasos de 20 dm³, preenchidos com o solo coletado na região de Ilha Solteira -SP. Foi realizado uma amostragem de solo utilizado para análise de atributos químicos em laboratório do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1. Com base nos resultados da análise química do solo, foi realizado uma calagem (14g calcário dolomítico por vaso) e aplicação de fertilizantes usando a recomendação oficial de adubação para o Estado de São Paulo (Boletim 100 do Instituto Agronômico de Campinas).

Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial duplo 6 x 2, sendo seis doses de Ni (0; 0,25; 0,50; 1; 3 e 9 mg kg⁻¹ de Ni) utilizando como fonte o sulfato de níquel (NiSO₄.6H₂O) e duas variedades ((RB 86 7515 e RB 96 6928), com quatro repetições totalizando 48 vasos. Como não havia recomendação ou qualquer trabalho publicado relacionado a aplicação de Ni na cana-de-açúcar, as doses recomendadas nesse projeto foram baseadas em aplicações de Ni em outras culturas como soja, arroz, milho desenvolvido pelo Prof. Dr. André Rodrigues dos Reis.

Para o preparo da solução estoque de micronutrientes, foram utilizados 2,7g de cloreto de manganês, 4,22 de sulfato de Zinco, 1,38 de ácido bórico, 06 de sulfato de cobre e 6,18 de molibdato de amônia. Dessa solução foi aplicado 100 mL em cada vaso.

Tabela 1. Atributos químicos do solo utilizado para realização do experimento. Ilha Solteira – SP, Brasil (2020).

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al---
CaCl ₂	g m ⁻³	mg dm ⁻³	-----mmol _c dm ⁻³ -----			
4,9	12	2	0,4	4	4	12
V%	Fe	Mn	Zn	Cu	B	
-----mg dm ⁻³ -----						
41	15	4,9	0,1	0,5	0,02	

2.2. Instalação e condução do experimento

As mudas pré-brotadas foram adquiridas com 4 semanas de emergência, livres de doenças, no viveiro de mudas da Syngenta, localizada no município de Paulínia – SP (Figura

1). As mudas foram transplantadas para um vaso de polietileno com capacidade para 20 kg de solo.

Para a condução do experimento foram selecionadas duas variedades do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a RB 867515 e a RB 966928. Como características produtivas a variedade RB 867515 não possui exigência de solos férteis, tem uma maturação mais tardia, tem boa brotação de soca e fechamento de entrelinha, é tolerante a seca e raramente floresce. Enquanto, que a RB 966928 também possui raro florescimento, tem uma ótima brotação e rebrota, sendo caracterizada por ser bem precoce e ter um bom fechamento de linha. (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro - RIDESA, 2010).

Após plantio das mudas pré-brotadas, foi realizada uma adubação de plantio com 20g do adubo 06-30-24 por vaso (Figura 3). O solo foi mantido em capacidade de campo durante toda a condução do experimento. Após 3 semanas de adaptação das plantas nos vasos foi realizada a primeira adubação com de níquel. O sulfato de níquel foi pesado (12,89 g em 2L de água) resultando em uma solução estoque que, posteriormente era colocada em uma proveta de 100 mL nas devidas proporções.

No tratamento $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ eram colocados 2,77 mL da solução estoque e o restante completado com água deionizada até atingir 100mL. Para os tratamentos 0,5; 1,0; 3,0; 9,0 mg kg^{-1} eram acrescentados a proveta, respectivamente, 5,55; 11,11; 33,33; 100 mL e depois completados com água deionizada até atingir os 100mL.



Figura 3: Mudanças de cana-de-açúcar pré-brotadas. Fonte: Próprio Autor (2020)



Figura 4: Mudas de cana-de-açúcar transplantadas no vaso com adubação de plantio. Fonte: Próprio Autor (2020)

Os perfilhos nos vasos receberam uma adubação de manutenção com 4g de uréia, 2,5 de KCl e 2g de superfosfato triplo por vaso. A variedade RB 96 6928 expressava deficiência severa de boro. Com isso, foi realizado uma adubação de boro, em todo o experimento, utilizando 0,6g de ácido bórico por vaso.

2.3. Variáveis Analisadas

Os parâmetros avaliados foram as análises biométricas em campo (altura, perfilho e diâmetro do colmo) e as análises bioquímicas nas folhas.

2.3.1 Análises biométricas em campo

As análises biométricas foram realizadas a cada 30 dias após a aplicação de Ni para acompanhar o crescimento da planta, sendo as variáveis:

- **Altura da planta:** realizada com auxílio de um trena, sendo medida do colo até a primeira lígula visível;
- **Perfilho:** Enumerava-se a quantidade de perfilho presentes em cada vaso;
- **Diâmetro do colmo:** realizado com o auxílio de um paquímetro, na parte mais grossa da planta.

2.3.2. Análises bioquímicas de folhas

Após dois meses de instalação do experimento e depois de uma semana da aplicação de níquel foram coletadas as folhas diagnoses de cada planta de cana-de-açúcar para extração de metabólitos. Elas foram levadas ao laboratório e realizada extração em nitrogênio líquido com posterior extração enzimática ou de metabólitos utilizando as respectivas soluções tampão para cada análise (Figura 5). Para a cana, a folha diagnóstica é a primeira folha da haste, conhecida como folha TVD (Top Visible Dewlap), ou folha +1 (DILLEWIJN, 1952).



Figura 5: Coleta e maceração de folha diagnose para extração de enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, concentração de peróxido de hidrogênio, análise de compostos nitrogenados (nitrato, amônia, aminoácidos) e açúcares (sacarose e açúcares totais). Fonte: Próprio Autor (2020).

➤ 2.3.2.1. Extração de compostos nitrogenados para análise e quantificação

Foi feita extração MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água) para análise de açúcares solúveis totais, sacarose, nitrato, amônia e aminoácidos. As amostras foram preparadas para análises de acordo com método descrito por Bieleski & Turner (1966), onde para cada grama de material fresco, acrescentou-se 10mL de solução MCW e triturou-se vigorosamente para posterior centrifugação. Posteriormente, foi adicionado 1mL de clorofórmio + 1,5mL H₂O para cada 4mL de sobrenadante. Em seguida, depois da separação de fases utilizou-se a fase hidrossolúvel para análise de compostos nitrogenados.

➤ **2.3.2.1.1. Determinação de Nitrato**

Para determinação de nitrato foi utilizado o método de Cataldo et al. (1975) para quantificar-se as variações na concentração de nitrato presente nas folhas. Utilizou-se 50uL do sobrenadante + 40uL ácido salicílico 5% em H₂SO₄. Após 20 minutos em temperatura ambiente acrescentou-se 1mL de NaOH 2N. A leitura foi feita em espectrofotômetro $\lambda = 410\text{nm}$. A concentração de nitrato foi determinada usando a curva padrão para solução de nitrato de sódio. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$.

➤ **2.3.2.1.2. Determinação de Amônia**

Para a determinação de amônia solúvel foi utilizado o método de McCullough (1967). Utilizou-se 100uL do sobrenadante + 500uL da solução fenol (2,5g de fenol + 12,5 mg de nitroprusiato de sódio) + 500uL de solução fosfato (1,25g NaOH + 13,4g de Na₂HPO₄·7H₂O + 2,5mL NaOCl 5%). O ensaio foi incubado por 1 hora a 37°. Posteriormente, seguiu-se a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 630$. A concentração de amônia foi determinada utilizando-se curva padrão de solução sulfato de amônia. Os resultados são expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ (matéria seca).

➤ **2.3.2.1.3. Determinação de Aminoácidos totais**

Para determinação de Aminoácidos solúveis totais nas folhas, foi utilizado o método de Yemm & Cocking (1955). Utilizou-se 300uL de sobrenadante + 500uL de citrato de sódio 0,2M + 200uL de solução ninhidrina 5% em metil glicol + 1mL de solução KCN 0,0002M seguido de aquecimento a 100°C por 20 minutos sendo resfriado em temperatura ambiente para posterior inclusão de 1mL de etanol 60%. A leitura foi feita em espectrofotômetro $\lambda = 570\text{nm}$. As concentrações de aminoácidos foram determinadas através de uma curva padrão de metionina. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$.

➤ **2.3.2.2. Determinação de carboidratos**

A partir do extrato obtido no item 2.3.1, as amostras foram utilizadas para determinação de açúcares solúveis totais e sacarose.

➤ **2.3.2.2.1. Determinação de açúcares solúveis totais**

Utilizando o método do fenol sulfúrico Dubois et al. (1956), quantificamos os açúcares solúveis totais. Utilizou-se 10uL de sobrenadante + 500uL solução fenol 5% + 2mL H₂O₄. A leitura foi feita em espectrofotômetro $\lambda=490\text{nm}$. A quantificação da análise foi baseada em uma curva padrão de sacarose. Os resultados foram expressos em $\text{mg g}^{-1}\text{ FW}$.

➤ **2.3.2.2.2. Determinação de sacarose**

A sacarose foi estimada seguindo o método Van Handel (1968), no qual foi utilizado 50uL de sobrenadante + 500uL de KOH 30% e 2mL de H₂SO₄. Após feita a solução, a mesma foi agitada e levada para estufa, onde se manteve por 10 minutos a 100 °C e em seguida resfriada a temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro $\lambda=490\text{nm}$. A quantificação da análise foi baseada em uma curva padrão de sacarose. Os resultados foram expressos em $\text{mg g}^{-1}\text{ FW}$.

➤ **2.3.2.3. Determinação de pigmentos fotossintéticos**

Através das análises de pigmentos fotossintéticos são adquiridos leituras diretas e indiretas de clorofila. Utilizou-se 0,2g de material fresco macerado + 2 ml de acetona 80%, armazenado durante 24h em geladeira. A quantificação dos teores de clorofila a (ca), clorofila b (cb) e clorofila total (ca+b), foram obtidos de acordo com o método de Lichtenthaler (1987). As leituras foram realizadas utilizando espectrofotômetro $\lambda=665,4$; $\lambda=663,2$; $\lambda=653,4$; $\lambda=646,8$; $\lambda=470\text{nm}$.

➤ **2.3.2.4. Determinação do metabolismo antioxidante**

Foi preparada a solução tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,5, que continha sacarose 7%, β -mercaptoetanol 14 mM, ácido ascórbico 250 mM, ditioneitol 20 mM, metabissulfito de sódio 20 mM, sódio 20 mM tetraborato e KCl 10mM. Posteriormente, os extratos homogeneizados foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 min a 4 °C. Depois de preparada essa solução, o sobrenadante foi utilizado para determinações de proteínas totais, como citado por Bradford (1976), atividade da superóxido dismutase (SOD), por Ginnapolitis e Ries (1977), atividade da catalase (CAT), por Azevedo et al. (1988), atividade da ascorbato peroxidase (APX), por Moldes et al. (2008).

➤ **2.3.2.4.1. Determinação de proteínas totais**

Para a determinação de proteínas totais, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), no qual, utiliza-se o BSA (soro de albumina bovina) como padrão. Para a reação foi usado 10 uL sobrenadante + 1 mL do reagente Bradford. As leituras são realizadas utilizando um espectrofotômetro $\lambda=595$ nm. As concentrações de proteínas totais foram quantificadas através de uma curva padrão de BSA. Os resultados são expressos em mg g^{-1} MS (matéria seca).

➤ **2.3.2.4.2. Atividade de superóxido dismutase (SOD, EC: 1.151.1)**

A atividade de SOD foi determinada por Giannopolitis e Ries (1977). Foi utilizada 50 uL da sobrenadante + 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 + 200 uL de nitroblue de tetrazólio (NBT) 75 uM + 200 uL de EDTA 0,1Mm + 250 uL de metionina 13 mM + 250 uL de riboflavina 2 uM. Os tubos de ensaio foram levados a uma câmara de reação sob iluminação artificial de lâmpadas fluorescente de 15W a 25°C por 20 minutos, para resultar o composto de formazan azul. As leituras foram realizadas utilizando espectrofotômetro $\lambda=560$ nm. Os resultados foram expressos em Unidade SOD mg^{-1} proteína.

➤ **2.3.2.4.3. Atividade da Catalase (CAT, EC: 1.11.1.6)**

Seguindo a metodologia descrita por Azevedo et al. (2008), foram analisadas a atividade da catalase através da degradação da H_2O_2 durante um minuto, a $\lambda = 240\text{nm}$, em temperatura ambiente. Aproveitou-se de 25 uL do sobrenadante + 1 mL do Tampão A (tampão fosfato de potássio 100 nM (pH 7,5) + 25 uL H_2O_2). O resultado foi expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

➤ **2.3.2.4.4. Atividade de Ascorbato peroxidase (APX, EC: 1.11.1.11)**

Como descrito por Moldes et al. (2008), a atividade de ascorbato peroxidase foi monitorada por um período de um minuto, em temperatura ambiente, num espectrofotômetro UV-Vis $\lambda = 290\text{nm}$ em cubeta de quartzo. A reação necessitou de 100uL de sobrenadante + 690 uL da solução tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,5) + 100uL de ascorbato 5 Mm +100 uL de EDTA 1 mM, mantido a 30°C no escuro durante 5 minutos. Posteriormente, é adicionado 100 uL de H_2O_2 1 mM para realização da leitura e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

➤ **2.3.2.5. Determinação do estresse oxidativo**

Para as análises de conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA) foi realizada a extração do ácido tricloroacético (TCA), como descrito por Heath e Packer (1968). 0,4g do material vegetal foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Posteriormente, o material já macerado foi adicionado com 4 mL de 0,1% TCA (w/v) + 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) em um tubo falcon de 15 mL. Em seguida, o material foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 min a 4 °C.

➤ **2.3.2.5.1. Conteúdo de Peroxido de Hidrogênio**

Para a análise de conteúdo de Peroxido de Hidrogênio (H₂O₂), foi utilizado a metodologia de Alexieva et al. (2001). Foi utilizado 200 µL do sobrenadante + 200 µL de tampão fosfato de potássio e 800 µL de solução iodeto de potássio (KI) 1M. Em seguida, as amostras foram mantidas em gelo por uma hora e posteriormente mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. As leituras foram realizadas utilizando espectrofotômetro $\lambda=390$ nm. A concentração de peróxido de hidrogênio no tecido foliar foi calculada com base na curva padrão de H₂O₂ e os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MS (Matéria fresca).

➤ **2.3.2.5.2. Peroxidação lipídica – Malondialdeído (MDA)**

A peroxidação lipídica ou MDA, seguiu os protocolos descritos por Shimizu. Hosogi e Park (2006). Utilizou-se 250 µL do sobrenadante em 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% + ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. Consequente, foram mantidas em seco a 95°C por 30 minutos e resfriadas em gelo por 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. As leituras foram realizadas utilizando espectrofotômetro $\lambda=600$ nm e $\lambda=535$ nm e o resultados foram expressos em nmol MDA g⁻¹ FW.

➤ **2.3.2.6. Determinação da atividade da urease**

Seguindo o protocolo descrito por Witte (2001), cortou-se com um perfurador de 5 mm discos foliares até obter 0,2 g de material vegetal. Depositou-se em um tubo Falcon de 15 mL e em seguida, adicionou 5 mL da solução fosfato de potássio 100 mM Ph 7,5 e incubou-se à 30 °C por 3 horas, agitando de 5 em 5 minutos. Para fazer a solução tampão fosfato com ureia, dissolveu 1,4 g de fosfato monossódico (NaH₂PO₄) em 50 mL de água destilada em um

recipiente e em outro dissolveu 18 g de Fosfato dissódico em 250 mL de água destilada. Misturou-se 38 mL da primeira solução com 202 mL da segunda e mediu-se o pH até estabilizar em 7,5. Acrescentou-se 25 mL de n-propanol + 6,5 g de ureia e completou-se com 500 mL com água destilada. Em seguida foi armazenado em frasco âmbar a 4 °C no escuro por um mês.

Para determinação do N-NH₄, foi utilizado o método de McCullough (1967). O reagente I é composto por 7 g de Fenol (0,74 M) + 0,034 g Nitroprussiato de sódio (1,14mM) e completou para 100 mL à solução, posteriormente, foi armazenado em frasco âmbar a 4 °C no escuro por um mês. O reagente II continha 2,96 g NaOH (0,37 M) + 140 mL de MilliQ-H₂O + 11,64 g Na₂HPO₄ (0,41 M) + 90 mL NaOCl (2,25% Cl₂) e completar para 200 mL. Armazenar em temperatura ambiente no escuro por um mês.

Para a reação, foi utilizado tudo eppendorf 1,5 mL e colocou sucessivamente 15 uL da solução diluído em 1500 µL de H₂O + 100 µL do reagente I e agitar + 200 µL do reagente II e agitar. Deixar em banho-maria a 50°C, por 20 minutos. Esperar atingir a temperatura ambiente e ler em espectrofotômetro $\lambda=636$ nm. A atividade da enzima foi determinada pela quantidade de amônio (NH₄⁺) produzida e, através de uma curva padrão estabelecida utilizando-se NH₄Cl como padrão amônio, os forem obtidos foram comparados. Os resultados são expressos em µmol NH₄⁺ h⁻¹ g⁻¹ MF.

➤ 2.3.2.7. Determinação da atividade da redutase do nitrato

Como modificado por Reis et al. (2007), a atividade da redutase do nitrato foi realizada próximo as 10h da manhã, coletando 0,2 g de material fresco na forma de discos que então eram colocadas em tubos de ensaio contendo 3 mL da solução tampão fosfato de potássio pH 7,4 (50mmol + KNO₃ 200 mmol). Posteriormente, esses tubos de ensaio serão incubados em banho maria a 33°C por 30 minutos ao abrigo da luz, envoltas com folha de papel alumínio. Em seguida, em outro tubo de ensaio foi pipetado 400 uL do extrato + 0,5 mL Sulfanilamida a 1% em HCl 2M + 0,5 mL de naftilenodiamino 0,05% a solução passou pelo vórtex e aguardou 15 minutos para realizar a leitura a 540 nm em um espectrofotômetro. A atividade dessa enzima é estimada pela concentração de nitrito (NO₂⁻) produzida, comparando esses valores obtidos em curva padrão para esse íon. Os resultados são expressos em µmol NO₂⁻ h⁻¹ g⁻¹ MF.

➤ 2.3.2.8. Análises nutricionais

As folhas diagnoses no final do experimento, foram secas em estufa a 65°C até uma massa constante e em seguida moídas em moinho Wiley de aço inoxidável. As determinações de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês, zinco e níquel foram conduzidas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) de acordo com **Thomas et al. (2016)**. A determinação de N foi realizada nas amostras de folha seguindo a metodologia proposta por **Silva (1999)**.

➤ 2.4. Análise estatística

Os dados foram primeiramente submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey a $p < 0.05$. Foi realizado o teste da correlação linear de Pearson utilizando o software R versão 4.0.3

4. RESULTADOS

Pigmentos fotossintéticos

Houve interação entre os fatores analisados para todas as variáveis avaliadas nesse trabalho. A aplicação de Ni nas doses de 0.25 e 3 mg kg⁻¹ para variedade RB 966928 e de 1 mg kg⁻¹ para variedade RB 867515 aumentou os teores de clorofila A, clorofila B e clorofila total, carotenoides, feofitina A e feofitina total. O maior incremento dessas variáveis foi observado na variedade RB 966928 em todas as aplicações de Ni, no entanto quando aplicado a dose de 1 mg kg⁻¹ não houve diferença entre as variedades, exceto para a teor de carotenoides onde a variedade RB 867515 apresentou maior resultado (Figura 6).

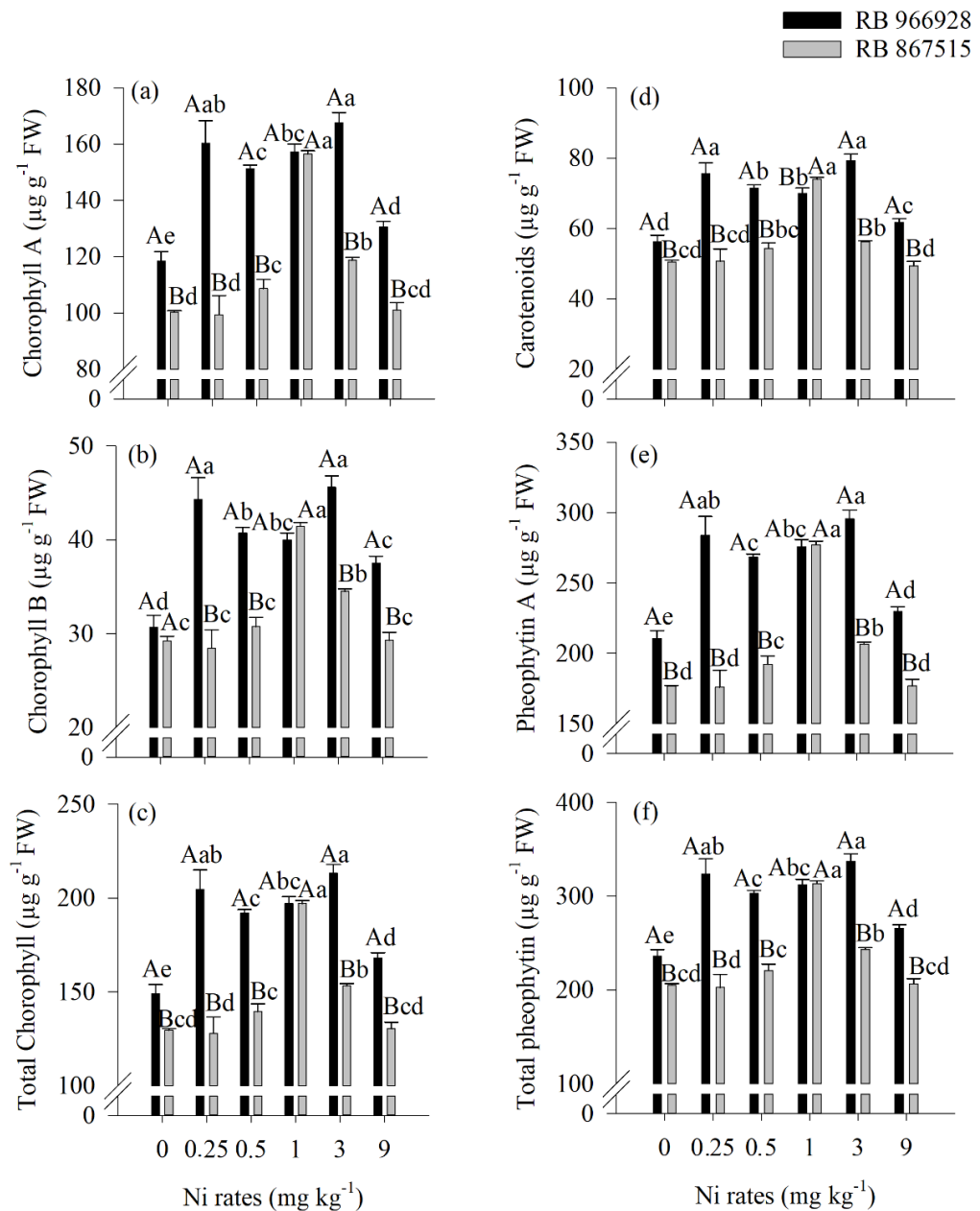


Figura 6: Efeitos da aplicação de doses de Ni na concentração de clorofila A (a), clorofila B (b), clorofila total (c), carotenoides (d), feofitina A (e) e feofitina total (f) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$.

Metabolismo do nitrogênio

Com relação aos resultados da urease, conforme aumentou-se as doses aplicadas de Ni, houve aumento na concentração dessa variável para variedade RB 867515 onde o incremento máximo foi observado nas doses de 3 e 9 mg kg⁻¹. Para a variedade RB 966928 o maior resultado observado foi quando se aplicou Ni na dose de 1 mg kg⁻¹. A variedade RB 867515 apresentou maior concentração de urease em todas as doses aplicadas (Figura 7a).

Para os valores de redutase do nitrato, a variedade RB 966928 apresentou aumento dessa variável conforme elevou-se a dose até 1 mg kg⁻¹ seguido de um decréscimo nas doses de 3 e 9 mg kg⁻¹ de Ni. Para variedade RB 867515 houve incremento da redutase do nitrato quando se aumentou a dose aplicada de Ni em até 3 mg kg⁻¹ com posterior redução na dose de 9 mg kg⁻¹. Em doses mais elevadas de Ni, a variedade RB 966928 apresentou maior sensibilidade comparada a RB 867515, com decréscimo mais elevado de redutase do nitrato (Figura 7b).

Houve influência do Ni na concentração do nitrato para as duas variedades. As variedades RB 966928 e RB 867515 apresentaram incremento máximo do teor de nitrato até a dose de Ni 0.5 e 3 mg kg⁻¹, respectivamente. A variedade RB 966928 teve maior redução na concentração do nitrato em doses mais elevadas de Ni comparada a RB 867515. Por outro lado, quando aplicado Ni na dose de 0.50 mg kg⁻¹ a variedade RB 966928 teve maior resultado na concentração do nitrato comparado a outra variedade nessa mesma dose (Figura 7a).

Com relação aos resultados da concentração de amônia, houve decréscimo dessa variável conforme aumentou-se as doses de Ni para variedade RB 966928. Por outro lado, quando aplicado Ni na dose de 1 mg kg⁻¹ na variedade RB 867515 houve aumento da concentração de amônia comparado ao controle e as demais doses. Comparando as variedades de cana, a RB 966928 apresentou maior sensibilidade a presença do Ni com redução mais acentuada na concentração de amônia (Figura 8b).

Houve influência da aplicação de Ni na concentração de açúcares totais nas duas variedades. Conforme elevou-se as doses de Ni até 3 mg kg⁻¹ na variedade RB867515, houve aumento na concentração de açúcares totais. Por outro lado, a variedade RB 966928 teve incremento na concentração de açúcares totais conforme aumentou as doses de Ni onde o maior resultado observado foi na maior dose aplicada.

Para concentração de aminoácidos, foi observado aumento nas doses de 1, 3 e 9 mg kg⁻¹ para variedade RB966928. Para a variedade RB867515, os maiores resultados foram obtidos nas plantas que receberam aplicação de Ni nas doses de 1 e 9 mg kg⁻¹ (Figura 8d). A maior

concentração de aminoácidos foi observada na variedade RB966928 em todas as doses de Ni aplicadas.

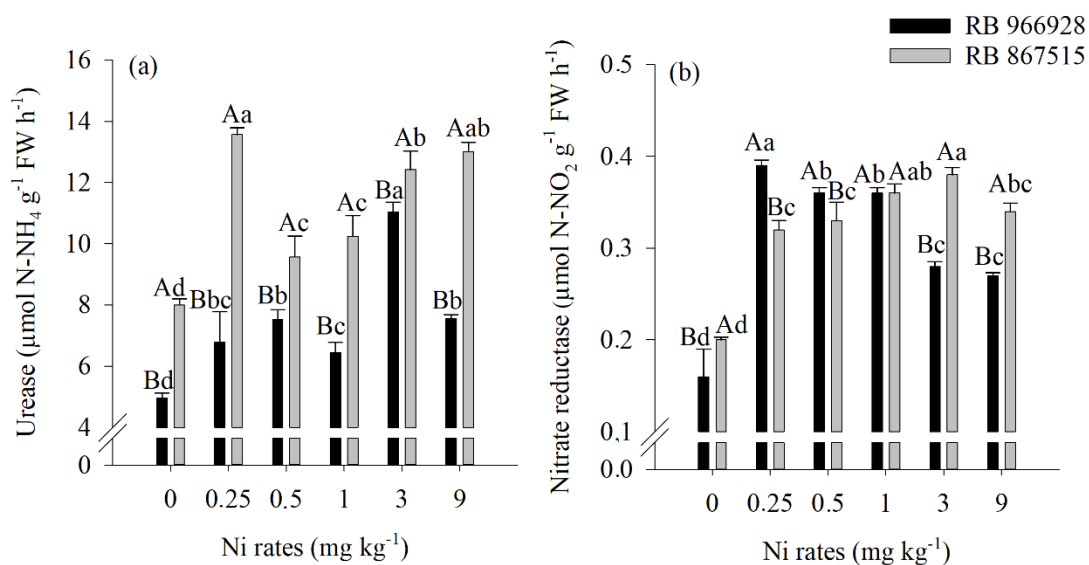


Figura 7: Efeitos da aplicação de Ni na atividade da urease (a) e redutase do nitrato (b) em variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$.

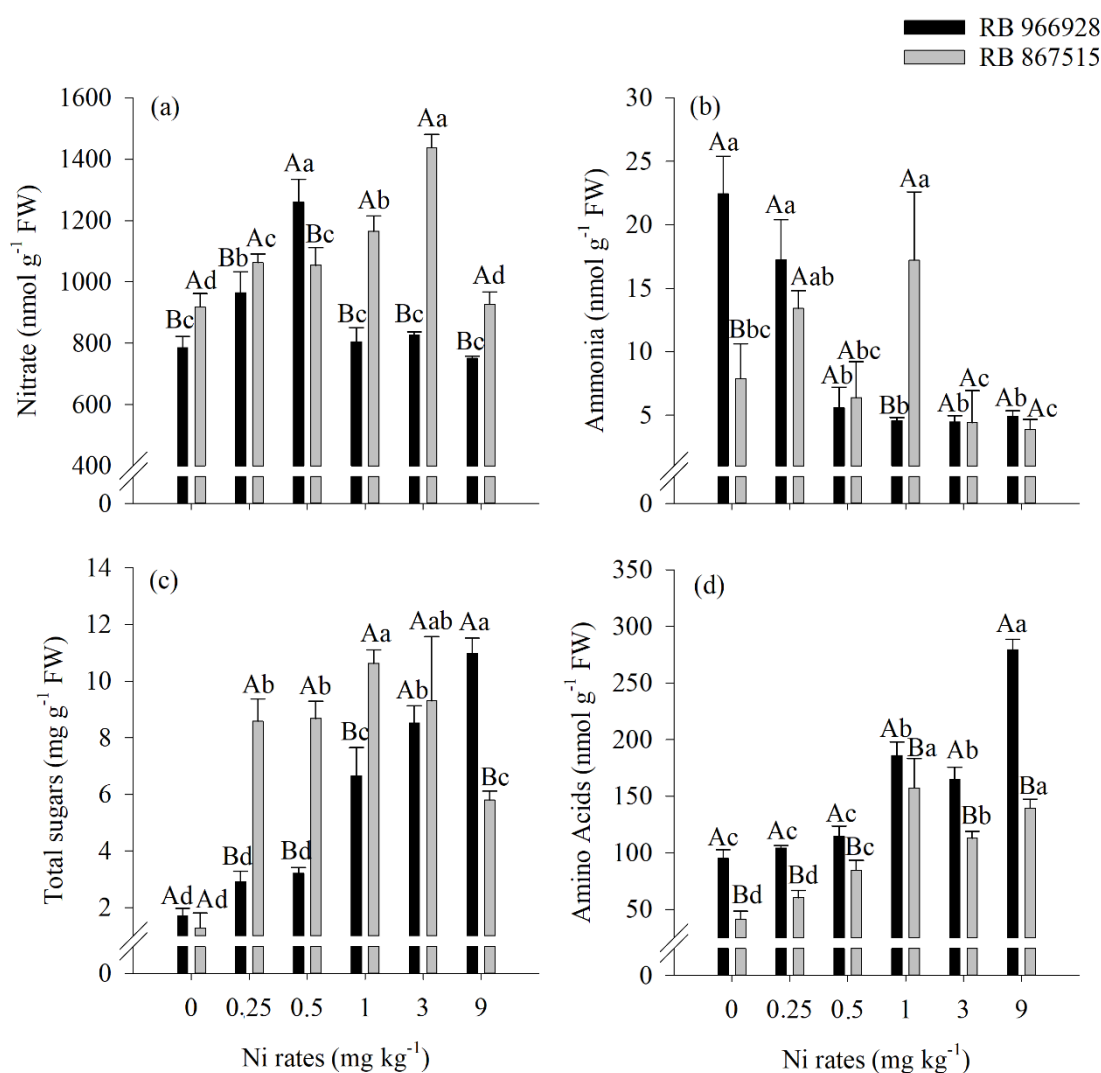


Figura 8: Efeitos da aplicação de Ni na concentração de nitrato (a), amônia (b), açúcares totais (c) e aminoácidos (d) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$.

Estresse oxidativo

Com relação aos resultados de H_2O_2 , a aplicação de Ni em doses acima de 0.5 mg kg^{-1} diminuiu os valores dessa variável para variedade RB867515. Já para variedade RB966928, houve decréscimo na concentração de H_2O_2 quando aplicou Ni na dose de 9 mg kg^{-1} (Figura 9a).

Houve influência da aplicação do Ni na concentração de MDA nas duas variedades de cana. Para variedade RB966928, houve decréscimo na concentração de MDA quando aplicou

Ni nas doses de 1 e 3 mg kg⁻¹. Para variedade RB867515 foi observado diminuição na concentração de MDA quando aplicou Ni na dose de 0.5 mg kg⁻¹. A concentração de MDA foi menor na variedade RB867515 quando comparada a variedade RB966928 em todas as doses, exceto a de 3 mg kg⁻¹ que não houve diferença estatística significativa entre as variedades (Figura 9b).

Para os resultados da atividade enzimática da SOD, o maior valor foi observado quando se aplicou Ni na dose de 0.25 mg kg⁻¹ na variedade RB966928. Para variedade RB867515 a aplicação de Ni na dose de 0.5 mg kg⁻¹ aumentou a atividade enzimática da SOD, no entanto quando se aplicou Ni em doses mais elevadas 1, 3 e 9 mg kg⁻¹ diminuiu a atividade da SOD. A atividade enzimática da SOD foi maior variedade RB966928, exceto no controle e na dose de 0.5 mg kg⁻¹ que não houveram diferença estatística significativa (Figura 9c).

A aplicação de Ni nas doses de 1 e 9 mg kg⁻¹ para as variedades RB966928 e RB867515 aumentaram a atividade da CAT em relação ao controle e as demais doses, respectivamente. A atividade da CAT foi maior na variedade RB966928, exceto nas doses de 1 e 3 mg kg⁻¹ que não houveram diferença estatística significativa entre as doses (Figura 9d).

Houve influência da aplicação de Ni da atividade enzimática da APX nas duas variedades de cana. Para variedade RB966928 houve aumento máximo na atividade da enzima quando aplicou a dose de 0.25 mg kg⁻¹ com posterior decréscimo nas doses superiores. Já para variedade RB867515 a aplicação de Ni nas doses de 0.25, 0.50 e 9 mg kg⁻¹ aumentaram a atividade da enzima APX comparado as demais doses. A variedade RB966928 apresentou melhores resultados comparado a variedade RB867515 exceto nas doses de 0.50 e 9 mg kg⁻¹ (Figura 9e).

A concentração de proteínas totais aumentou quando aplicou Ni nas doses de 1 e 3 mg kg⁻¹ nas variedades RB867515 e RB966928, respectivamente. A variedade RB867515 apresentou maior concentração de proteínas totais em todas as doses analisadas nesse trabalho (Figura 9f).

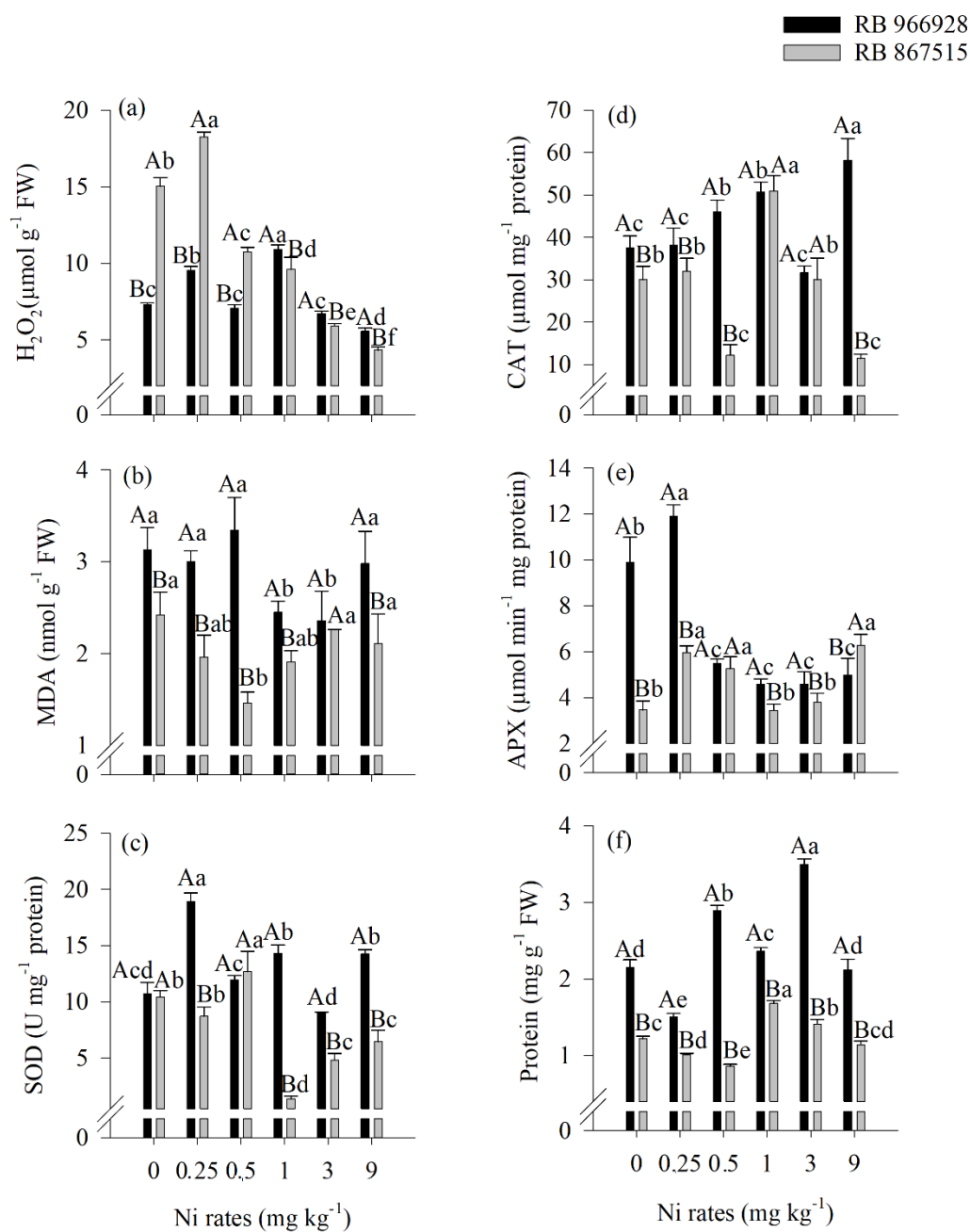


Figura 9: Efeitos da aplicação de Ni na concentração de H_2O_2 (a), MDA (b), SOD (c), CAT (d), APX (e) e proteína (f) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$.

Características biométricas e produtividade

Com relação aos resultados da massa seca de raiz, houve incremento nessa variável quando aplicou Ni na dose de 3 mg kg^{-1} para variedade RB867515. Já para variedade RB966928 houve aumento da massa seca de raiz até a dose de 3 mg kg^{-1} com posterior decréscimo na dose de 9 mg kg^{-1} . A variedade RB867515 teve maior resultado em todas doses de Ni comparada a variedade RB966928 (Figura 10a).

Houve influência da aplicação de Ni para a massa seca das folhas para as duas variedades. Todas as doses de Ni aumentaram o teor de massa seca das folhas para variedade RB867515, sendo o maior incremento na dose de 3 mg kg^{-1} . Para variedade RB966928 a aplicação de Ni nas doses de 1 e 3 mg kg^{-1} aumentou o teor de massa seca das folhas em comparação com o controle. Em todas as doses de Ni, a variedade RB867515 teve maior valor dessa variável compara a outra variedade (Figura 10b).

A aplicação de Ni afetou no número de perfilhos e na altura de planta. O Ni na dose de 0.25 mg kg^{-1} para a variedade RB 966928 proporcionou maior número de perfilhos e altura de planta. Para a variedade RB867515 a aplicação de Ni na dosagem de 0.5 mg kg^{-1} aumentou o número de perfilhos e altura de planta em relação as demais doses (Figura 10c e 10d).

O peso seco dos colmos foi afetado pelas doses de Ni e pelas variedades de cana. Para variedade RB 966928 a aplicação de 0.25 e 0.50 mg kg^{-1} de Ni aumentou o peso seco dos colmos comparado as outras doses e ao controle. Para a variedade RB867515 a aplicação de Ni nas doses de 0.50 e 1 mg kg^{-1} aumentou o peso seco dos colmos em relação as demais doses e ao controle (Figura 10e).

A produtividade da cana de açúcar foi afetada pelas doses de Ni. Para variedade RB966928 houve incremento da produtividade até a dose de 0.5 mg kg^{-1} de Ni, com posterior decréscimo em doses maiores. Para variedade RB867515 houve incremento da produtividade até a dose de 1 mg kg^{-1} e decréscimo nas doses seguintes (Figura 10f).

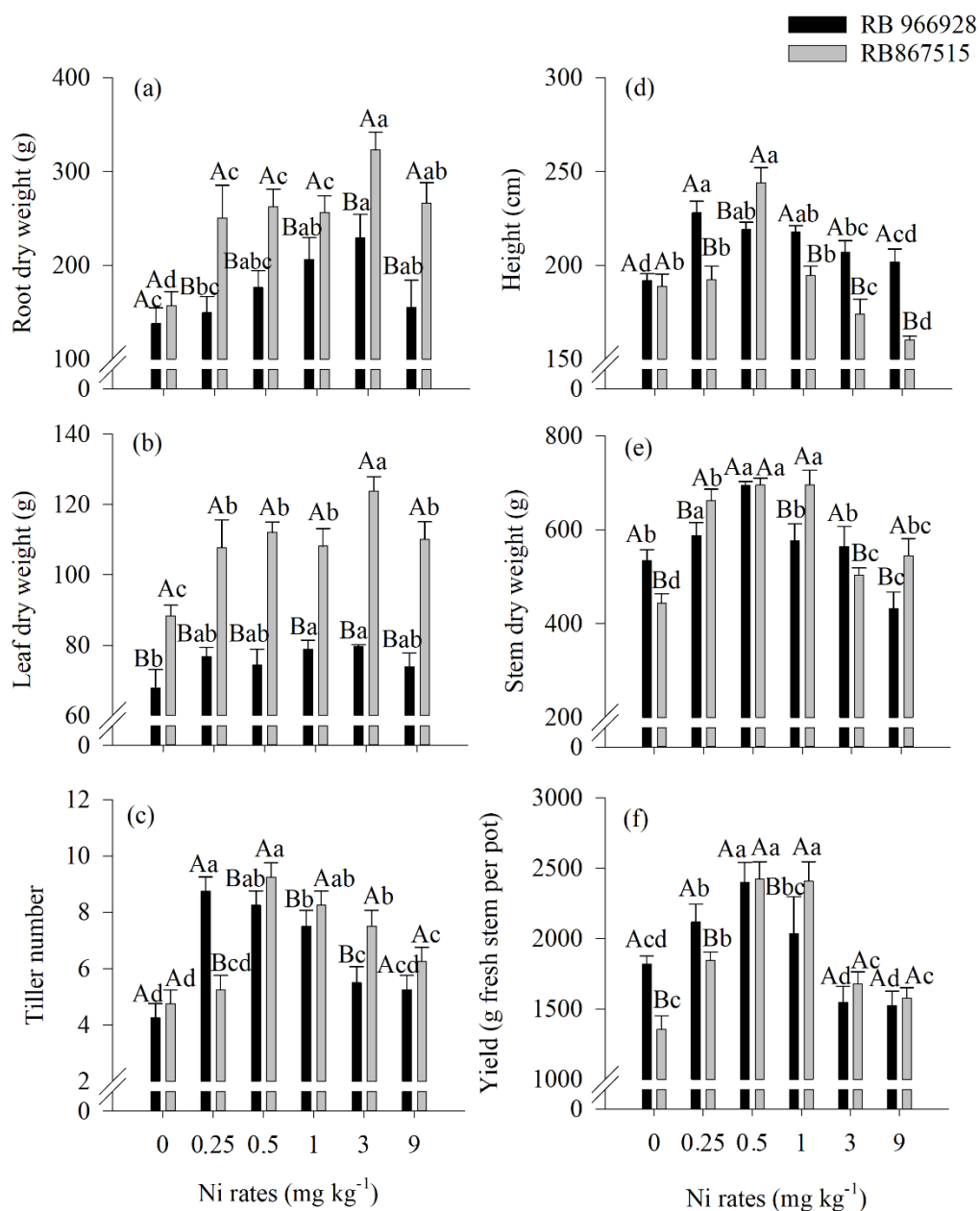


Figura 10: Efeitos da aplicação de Ni na concentração de massa seca da raiz (a), massa seca das folhas (b), número de perfilhos (c), altura (d), massa seca de colmos (e) e produtividade (f) em duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$.

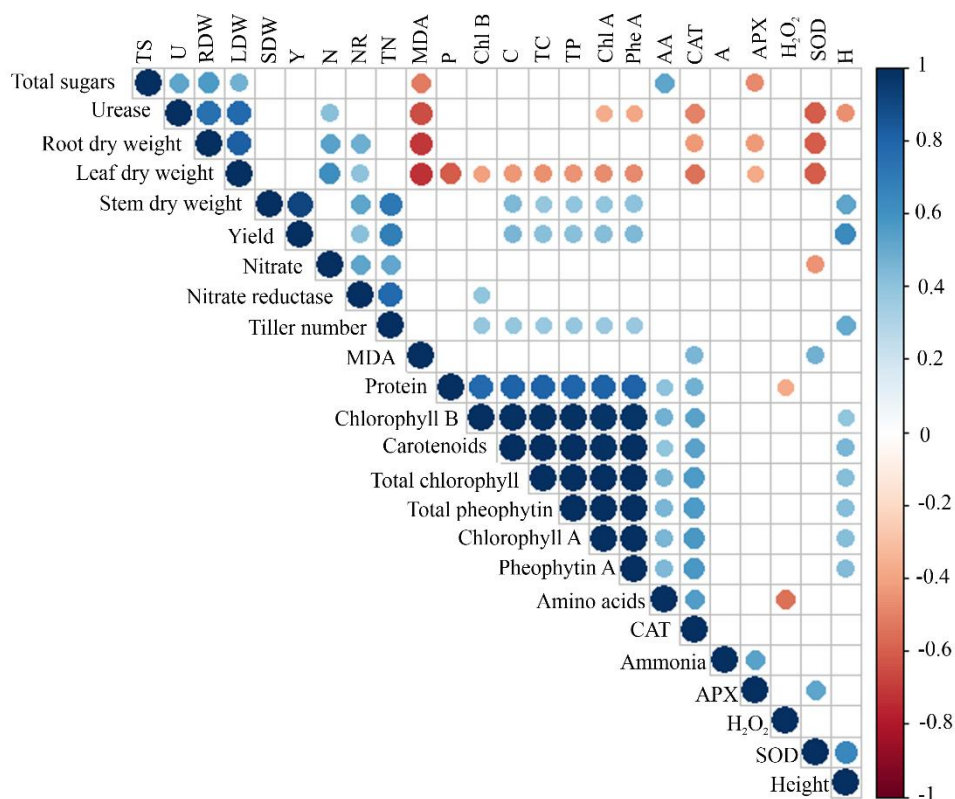


Figura 11: Correlação linear de Pearson das variáveis de variedades de cana submetida aplicação de doses de Ni. Espaços em branco indica não significância entre as variáveis a $p > 0.05$.

Concentração de nutrientes

A aplicação de doses de Ni aumentou diretamente a concentração de Ni nas folhas de cana de açúcar em ambas variedades (Figura 12). A maior dose aplicada (9 mg Ni kg^{-1}) proporcionou aumento de 33 vezes na concentração de Ni em relação ao controle para a variedade RB 966928, e 18 vezes para a variedade RB 867515. Comparando a capacidade de absorção de Ni entre variedades, nas doses de 1 mg Ni kg^{-1} ou inferiores, não foi observada diferença entre variedades, porém, nas doses de 3 e 9 mg Ni kg^{-1} a variedade RB 867515 apresentou maiores concentrações de Ni em comparação à RB 966928. De modo geral, a aplicação de Ni não afetou a concentração dos demais nutrientes de forma direta, sendo as diferenças observadas possivelmente erráticas (tabelas 2 e 3).

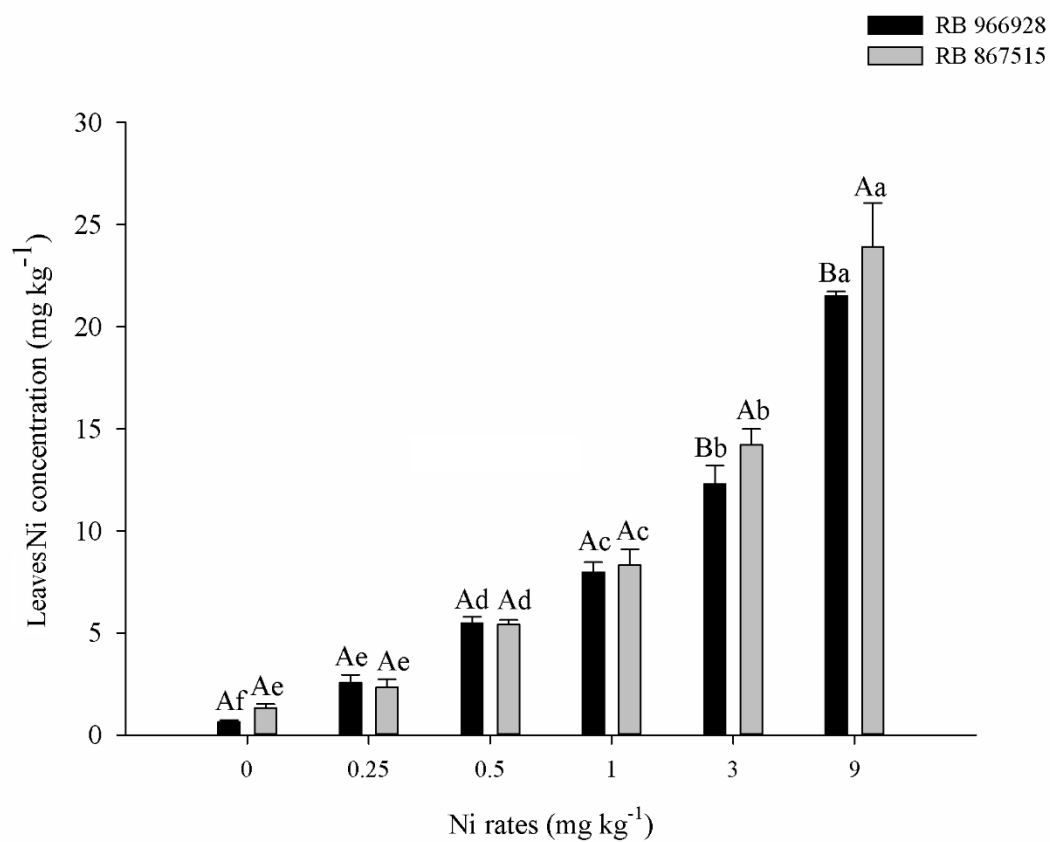


Figura 12: Efeitos da aplicação de Ni na concentração de Ni em folhas de duas variedades de cana. Letras maiúsculas distintas diferem médias das variedades dentro das doses de Ni e letras minúsculas distintas diferem médias das doses de Ni em cada variedade de cana pelo teste de Tukey a $p < 0.05$.

Tabela 2: Concentração de elementos em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar em resposta a doses de Ni. Letras maiúsculas indicam a diferença entre as Variedades. Letras minúsculas indicam a diferença entre as doses de Ni. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Média $\pm$ DP (n = 4).

Variedade	Dose de Ni (mg kg ⁻¹)	P	K	Ca (g kg ⁻¹ MS)	Mg	S	Si
RB 966928	0	2,52 $\pm 0,098$ Aa	8,45 $\pm$ 0,143 Abc	2,6 $\pm$ 0,066 Ab	1,23 $\pm 0,072$ Aa	0,83 $\pm 0,025$ Ab	4,07 $\pm 0,292$ Aa
	0,25	2,79 $\pm 0,081$ Aa	8,27 $\pm$ 0,568 Bc	2,4 $\pm$ 0,151 Abc	1,29 $\pm 0,09$ Bc	0,85 $\pm 0,038$ Aab	3,67 $\pm 0,735$ Aa
	0,5	2,73 $\pm 0,174$ Aa	9,07 $\pm$ 0,641 Aabc	2,51 $\pm 0,004$ Abc	0,89 $\pm 0,016$ Aab	0,95 $\pm 0,01$ Ab	3,9 $\pm$ 0,809 Aa
	1	2,41 $\pm 0,691$ Aa	10,22 $\pm 0,743$ Aa	2,24 $\pm 0,283$ Bc	1,15 $\pm 0,034$ Aab	0,91 $\pm 0,16$ Aa	2,41 $\pm 0,044$ Bb
	3	2,49 $\pm 0,615$ Aa	9,69 $\pm$ 0,512 Aab	2,92 $\pm 0,197$ Aa	1,12 $\pm 0,064$ Bbc	0,86 $\pm 0,137$ Ab	4,03 $\pm 0,516$ Aa
	9	3,09 $\pm 0,349$ Aa	10,09 $\pm 0,695$ Aa	2,51 $\pm 0,128$ Bbc	1,19 $\pm 0,067$ Ba	0,82 $\pm 0,061$ Aa	2,98 $\pm 0,156$ Bab
	0	2,46 $\pm 0,323$ Aa	8,68 $\pm$ 1,116 Ab	2,73 $\pm 0,118$ Aa	1,13 $\pm 0,035$ Aab	1,1 $\pm$ 0,033 Aa	4,6 $\pm$ 0,08 Aa
	0,25	2,78 $\pm 0,285$ Aa	9,39 $\pm$ 0,184 Aab	2,57 $\pm$ 0,145 Aabc	1,22 $\pm 0,016$ Ac	0,77 $\pm 0,067$ Aa	3,44 $\pm 0,292$ Ab
	0,5	2,39 $\pm 0,413$ Aa	9,84 $\pm$ 0,067 Aab	2,38 $\pm 0,039$ Abc	1,01 $\pm 0,012$ Abc	0,91 $\pm 0,087$ Aa	4,63 $\pm 0,268$ Aa
	1	1,95 $\pm 0,654$ Aa	8,64 $\pm$ 0,187 Bb	2,6 $\pm$ 0,113 Aab	1,19 $\pm$ 0,075 Aabc	0,79 $\pm 0,014$ Ba	4,46 $\pm 0,855$ Aab
	3	2,29 $\pm 0,679$ Aa	10,07 $\pm 0,712$ Aa	2,3 $\pm$ 0,142 Bc	1,18 $\pm 0,113$ Abc	1,1 $\pm$ 0,141 Ba	3,7 $\pm$ 0,776 Aab
	9	1,81 $\pm 0,14$ Aa	8,81 $\pm$ 0,449 Bb	2,75 $\pm 0,093$ Aa	1,33 $\pm 0,046$ Aa	0,86 $\pm 0,048$ Ba	4,58 $\pm 0,282$ Aa
RB 867515	0	2,52 $\pm 0,098$ Aa	8,45 $\pm$ 0,143 Abc	2,6 $\pm$ 0,066 Ab	1,23 $\pm 0,072$ Aa	0,83 $\pm 0,025$ Ab	4,07 $\pm 0,292$ Aa
	0,25	2,79 $\pm 0,081$ Aa	8,27 $\pm$ 0,568 Bc	2,4 $\pm$ 0,151 Abc	1,29 $\pm 0,09$ Bc	0,85 $\pm 0,038$ Aab	3,67 $\pm 0,735$ Aa
	0,5	2,73 $\pm 0,174$ Aa	9,07 $\pm$ 0,641 Aabc	2,51 $\pm 0,004$ Abc	0,89 $\pm 0,016$ Aab	0,95 $\pm 0,01$ Ab	3,9 $\pm$ 0,809 Aa
	1	2,41 $\pm 0,691$ Aa	10,22 $\pm 0,743$ Aa	2,24 $\pm 0,283$ Bc	1,15 $\pm 0,034$ Aab	0,91 $\pm 0,16$ Aa	2,41 $\pm 0,044$ Bb
	3	2,49 $\pm 0,615$ Aa	9,69 $\pm$ 0,512 Aab	2,92 $\pm 0,197$ Aa	1,12 $\pm 0,064$ Bbc	0,86 $\pm 0,137$ Ab	4,03 $\pm 0,516$ Aa
	9	3,09 $\pm 0,349$ Aa	10,09 $\pm 0,695$ Aa	2,51 $\pm 0,128$ Bbc	1,19 $\pm 0,067$ Ba	0,82 $\pm 0,061$ Aa	2,98 $\pm 0,156$ Bab
	0	2,46 $\pm 0,323$ Aa	8,68 $\pm$ 1,116 Ab	2,73 $\pm 0,118$ Aa	1,13 $\pm 0,035$ Aab	1,1 $\pm$ 0,033 Aa	4,6 $\pm$ 0,08 Aa
	0,25	2,78 $\pm 0,285$ Aa	9,39 $\pm$ 0,184 Aab	2,57 $\pm$ 0,145 Aabc	1,22 $\pm 0,016$ Ac	0,77 $\pm 0,067$ Aa	3,44 $\pm 0,292$ Ab
	0,5	2,39 $\pm 0,413$ Aa	9,84 $\pm$ 0,067 Aab	2,38 $\pm 0,039$ Abc	1,01 $\pm 0,012$ Abc	0,91 $\pm 0,087$ Aa	4,63 $\pm 0,268$ Aa
	1	1,95 $\pm 0,654$ Aa	8,64 $\pm$ 0,187 Bb	2,6 $\pm$ 0,113 Aab	1,19 $\pm$ 0,075 Aabc	0,79 $\pm 0,014$ Ba	4,46 $\pm 0,855$ Aab
	3	2,29 $\pm 0,679$ Aa	10,07 $\pm 0,712$ Aa	2,3 $\pm$ 0,142 Bc	1,18 $\pm 0,113$ Abc	1,1 $\pm$ 0,141 Ba	3,7 $\pm$ 0,776 Aab
	9	1,81 $\pm 0,14$ Aa	8,81 $\pm$ 0,449 Bb	2,75 $\pm 0,093$ Aa	1,33 $\pm 0,046$ Aa	0,86 $\pm 0,048$ Ba	4,58 $\pm 0,282$ Aa

Tabela 3: Concentração de elementos em folhas de duas variedades de cana-de-açúcar em resposta a doses de Ni. Letras maiúsculas indicam a diferença entre as Variedades. Letras minúsculas indicam a diferença entre as doses de Ni. Letras diferentes indicam a diferença entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Média $\pm$ DP (n = 4).

Variedade	Dose de Ni (mg kg ⁻¹)	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
(mg kg ⁻¹ MS)						
RB 966928	0	3,98 $\pm$ 0,188 Aabc	168,97 $\pm$ 89,414 Aa	37,3 $\pm$ 1,951 Ab	56,27 $\pm$ 1,638 Aa	12,33 $\pm$ 0,156 Ab
	0,25	5,04 $\pm$ 0,172 Aa	147,87 $\pm$ 51,029 Aab	52,48 $\pm$ 5,385 Aa	59 $\pm$ 2,179 Aa	48,25 $\pm$ 3,534 Aa
	0,5	3,3 $\pm$ 1,041 Ac	117,51 $\pm$ 30,983 Aab	35,88 $\pm$ 6,366 Ab	52,95 $\pm$ 9,834 Aab	18,73 $\pm$ 35,021 Ab
	1	4,96 $\pm$ 0,718 Aab	180,59 $\pm$ 32,369 Aa	34,12 $\pm$ 4,54 Bb	40,05 $\pm$ 6,714 Bc	11,91 $\pm$ 5,436 Ab
	3	2,83 $\pm$ 0,64 Bc	107,22 $\pm$ 30,525 Ab	35,96 $\pm$ 3,723 Ab	45,89 $\pm$ 4,591 Abc	11,56 $\pm$ 9,273 Ab
	9	3,55 $\pm$ 0,673 Abc	78,52 $\pm$ 24,821 Ab	37,36 $\pm$ 0,311 Ab	51,31 $\pm$ 4,941 Aab	10,77 $\pm$ 1,567 Ab
	0	3,32 $\pm$ 0,729 Aab	161,73 $\pm$ 11,47 Aa	41,31 $\pm$ 3,418 Ab	55,79 $\pm$ 1,671 Aa	11,78 $\pm$ 2,631 Aa
	0,25	3,36 $\pm$ 1,285 Ba	126,46 $\pm$ 25,903 Aab	36,84 $\pm$ 2,048 Babc	54,3 $\pm$ 2,758 Aa	16,16 $\pm$ 3,332 Ba
	0,5	3,93 $\pm$ 0,339 Aab	153,47 $\pm$ 12,701 Aab	33,9 $\pm$ 3,26 Abc	46,51 $\pm$ 4,046 Aab	15,12 $\pm$ 1,753 Aa
	1	2,39 $\pm$ 0,166 Bb	133,33 $\pm$ 8,175 Aa	39,85 $\pm$ 0,293 Aab	48,02 $\pm$ 4,26 Aab	13,75 $\pm$ 4,42 Aa
RB 867515	3	3,87 $\pm$ 0,171 Aa	72,44 $\pm$ 6,586 Ab	32 $\pm$ 2,026 Ac	42,99 $\pm$ 0,612 Ab	15,08 $\pm$ 0,599 Aa
	9	2,98 $\pm$ 0,624 Aab	95,32 $\pm$ 9,316 Ab	38,35 $\pm$ 2,113 Aabc	47,58 $\pm$ 1,667 Aab	11,84 $\pm$ 1,031 Aa

5. DISCUSSÃO

O complexo antena, formado pelos carotenoides, clorofila B e clorofila A, juntamente com feofitina A e feofitina total formam o sistema antioxidante não enzimático das plantas. A função dos carotenoides é proteger as plantas do excesso de luz solar (HABIBI, 2017), que pode causar aumento nas espécies reativas de oxigênio podendo levar a degradação da membrana das células e até a morte celular. Além disso, os carotenoides podem eliminar radicais livres e extinguir espécies de O_2^- (HUNTER, 2014).

Antioxidantes afetam os mecanismos moleculares regulando o aparelho fotossintético das plantas e o complexo antena em função da intensidade e qualidade da luz (MILLER, 2007). A concentração de clorofilas pode sofrer mudanças para regular e estabilizar o complexo antena, dado que cada componente fotossintético absorve luz em diferentes espectros. Então as plantas podem usar o Ni como um precursor desse sistema de adaptação sob situações de estresse.

A clorofila B filtra a luz solar e dissipa o excesso de energia, cuja feofitina possui a mesma função. Dessa maneira, o aumento desses pigmentos oriundo da aplicação de Ni, fazem com que as plantas fiquem mais tolerantes ao estresse abiótico. Aliado a isso, há um aumento da eficiência fotossintética em plantas que receberam Ni devido ao incremento de clorofila A que é responsável pela realização da fotossíntese. Nesse trabalho, o aumento na concentração dos pigmentos fotossintéticos, contribuiu para o aumento da produtividade, número de perfilhos, altura de planta e peso seco dos colmos (Figura 8).

O Ni é cofator da urease, que é responsável por transformar a ureia em amônia e CO_2 . Para que haja o transporte de N-uréia para os N-sink tissues, os vegetais produzem amônia, oriundo da hidrólise da uréia realizada pela urease (WINTER et al., 2015). A quebra da amônia produz aminoácidos onde um pool de aminoácidos livres influencia de forma positiva diversos processos de crescimento das plantas (OHYAMA et al., 2017).

Arkoun et al. (2013) avaliando a influência do Ni e de um inibidor de urease em plantas de colza com e sem adubação de ureia, notaram que a falta de Ni e a inibição da atividade da urease, influenciaram o metabolismo do nitrogênio, onde as principais enzimas responsáveis pela assimilação do nitrogênio no tecido vegetal (glutamina sintetase, glutamato sintetase e glutamato desidrogenase) foram reduzidas, demonstrando a importância e necessidade de

fornecer Ni para as plantas. Siqueira Freitas et al. (2018) verificaram que a aplicação de Ni aumentou a atividade da urease em genótipos de soja.

A redutase do nitrato é a primeira enzima de assimilação do nitrogênio, sendo de extrema importância para o metabolismo das plantas. O nitrogênio é absorvido como nitrato e transformado em nitrito e posteriormente reduzido a amônio, levando assim a planta o nitrogênio assimilado. Logo, uma maior atividade da redutase do nitrato pode indicar uma maior taxa de assimilação de nitrogênio ao longo do tempo (DOS SANTOS et al., 2017). Nesse estudo foi verificado que a redutase do nitrato está diretamente relacionada com o acúmulo de biomassa seca da raiz, colmos, folhas, produtividade e teor de nitrato nas plantas (Figura 8). Dos Santos et al. (2017) verificaram relação entre a atividade da redutase do nitrato e o acúmulo de biomassa seca em cana de açúcar.

A concentração de amônia diminuiu conforme aumentou-se as doses de Ni, porém a concentração de aminoácidos aumentou. Isso significativa de o Ni estimulou a conversão da amônia em aminoácidos. Então houve maior disponibilidade de nitrogênio orgânico para as células resultando em maior concentração de clorofila, fotossíntese e açúcares totais. Dessa maneira, quanto maior a concentração de açúcares totais nas plantas, maior é o acúmulo de biomassa fresca (Figura 12).

MDA e H_2O_2 são considerados bons biomarcadores para detectar estresse oxidativo em plantas (SILVA et al., 2018). O H_2O_2 possui capacidade de cruzar membranas celulares e migrar em compartimentos de diferentes tecidos (GRATÃO et al., 2005). Os danos ocasionados pela alta produção de H_2O_2 se espalha nas células das plantas, atuando como um indicador de estresse ambiental (GOUVEIA et al., 2020).

A SOD é a primeira ação enzimática contra o estresse oxidativo pelo O_2^- realizando a reação de dismutação formando O_2 e H_2O_2 . Posteriormente, o H_2O_2 é transformado em H_2O e O_2 pela ação direta ou indireta de enzimas como CAT e APX (LANZA E REIS, 2021).

Por aumentar a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e APX, o Ni aumenta a tolerância das plantas a estresses biótico e abiótico, uma vez que essas enzimas protegem as células das plantas contra radicais livres (GONZÁLEZ et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

A aplicação de Ni foi benéfica para as plantas de cana-de-açúcar por proporcionar aumento na concentração de pigmentos fotossintéticos na variedade RB 966928 em todas as aplicações, enquanto que, para a variedade RB 867515 a dose de 1 mg kg^{-1} foi a que melhor apresentou resultados. A aplicação de Ni também estimulou o aumento da concentração da urease e redutase do nitrato para a variedade RB 867515 conforme aumentou-se as doses. Enquanto que, para a variedade RB 966928 houve maior concentração de urease e redutase do nitrato nas doses $0,25$ e $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

A aplicação de Ni favoreceu positivamente o metabolismo do nitrogênio para as duas variedades, mais especialmente para a variedade RB 966928. Nota-se uma maior concentração de amônia na dose controle e um decaimento expressivo até a dose máxima, em consequência, percebe-se uma progressão na concentração de aminoácidos e de açúcares totais.

Para o metabolismo antioxidante, a aplicação de Ni também se mostrou favorável. Percebe-se que para as duas variedades houve uma diminuição na concentração de H_2O_2 . A variedade RB 966928 apresentou melhores concentrações de SOD e APX na dose de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ e para CAT na dose de $9,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Para a variedade RB 867515, a CAT apresentou melhores resultados na dose $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$, enquanto que a SOD e a APX apresentaram na dose $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$.

A aplicação de Ni também proporcionou aumento na produtividade na dose de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para as duas variedades.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v.24, p.1337-1344, 2001.

ANDREWS, R. K.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Urea and urease. **Advances in inorganic biochemistry**, v. 6, p. 245-283, 1984.

ARGENTA, G., SILVA, P.R.F., BORTOLINI, C.G., et al. Teor de clorofila na folha como indicador do nível de nitrogênio na planta de milho no espigamento. In: **REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE: MILHO & FEIJÃO**, 2, 1999, Lages, Resumos... Lages : UDESC/EPAGRI, 1999. p.44-49.

ARKOUN, M., JANNIN, L., Laîné, P., Etienne, P., Masclaux-Daubresse, C., Citerne, S., ... & Ourry, A. (2013). A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Plant and soil**, 362(1), 79-92. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1227-2>

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wildtype and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum** v. 104, p. 280-292. 1998.

BAI, C.; REILLY, C. C.; WOOD, B. W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant physiology**, New York, v. 140, n. 2, p. 433-443, 2006.

BARBOSA, K. B. F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010.

BETTINELLI, M.; BEONE, G. M.; SPEZIA, S.; BAFFI, C. Determination of heavy metals in soils and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 424, p. 289-296, 2000.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram 38 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-259, 1976.

BROWN, P. H., WELCH, R. M., & MADISON, J. T. (1990). Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. **Plant and Soil**, 125(1), 19-27.

BROWN, P.H.; WELCH, R.M. & CARY, E.E. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, 85(3):801-803, 1987.

CAPUTO, M. M. Acúmulo de sacarose, produtividade e florescimento de cana-de-açúcar sob reguladores vegetais. **INCI**, Caracas, v. 32, n. 12, p. 834-840, dic. 2007.

CARIDAD-CANCELA, R.; PAZ-GONZÁLEZ, A.; ABREU, C. A. Total and extractable nickel and cadmium contents in natural soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 36, p. 241-252, 2005.

CARVALHO, S. A. D. de, & FURTADO, A. T. (2013). O Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar no Brasil e o Desafio das Mudanças Climáticas Globais. **Revista Gestão & Conexões**, 2(1), 22–46. <https://doi.org/10.13071/regec.2317-5087.2013.2.1.4909.22-46>.

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

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. V.9 – SAFRA 2020/21 – N.2 – Segundo Levantamento/agosto 2022.

DEUNER, S.; ALVES, J. D.; ZANANDREA, I.; GOULART, P. F. P.; SILVEIRA, N. M.; HENRIQUE, P. C.; MESQUITA, A. C. Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 1, p. 77-85, 2011.

DILLEWIJN, C. van. **Botany of sugarcane**. Waltham: Chronica Botanica, 1952. 371 p.

DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R.L. & ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) a metalloenzyme: simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, 97(14):4131-4133, 1975.

DOS SANTOS, S. G., DA SILVA RIBEIRO, F., DA FONSECA, C. S., PEREIRA, W., SANTOS, L. A., & Reis, V. M. (2017). Development and nitrate reductase activity of sugarcane inoculated with five diazotrophic strains. **Archives of Microbiology**, 199(6), 863-873. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1357-2>

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 03, p. 350-356, 1956.

ESKEW, D.L.; WELCH, R.M. & CARY, E.E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher-plants. **Science**, 222(4624):621-623, 1983.

GANDUL-ROJAS, B., ROCA, M., MÍNGUEZ-MOSQUEIRA, M.I. Chlorophyll and carotenoid degradation mediated by thylakoid-associated peroxidative activity in olives (*Olea europaea*) cv. **Hojiblanca**. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p. 499- 507, 2004.

GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. **Plant and Soil**, v. 190, p. 153-162, 1997.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I Occorence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 1, p. 309–314, 1977.

GONZÁLES, C. I., MAINE, M. A., CAZENAVE, J., HADAD, H. R., & BENAVIDES, M. P. (2015). Ni accumulation and its effects on physiological and biochemical parameters of *Eichhornia crassipes*. **Environmental and Experimental Botany**, 117, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.006>

GOUVEIA, G. C. C., GALINDO, F. S., LANZA, M. G. D. B., da ROCHA SILVA, A. C., DE BRITO MATEUS, M. P., DA SILVA, M. S., ... & DOS REIS, A. R. (2020). Selenium toxicity stress-induced phenotypical, biochemical and physiological responses in rice plants: Characterization of symptoms and plant metabolic adjustment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 202, 110916. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110916>

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481-494, 2005.

GRATÃO,P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersiconesculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, v. 153, p. 321-333, 2008.

HABIBI, G., 2017. Physiological, photochemical and ionic responses of sunflower seedlings to exogenous selenium supply under salt stress. **Acta Physiol. Plant.** 39, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2517-3>.

HARTEMINK, A. E. Sugarcane for bioethanol: soil and environmental issues. **Advances in Agronomy** 99, p.125-182, 2008.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, v. 125, p. 2141-2145, 1968.

HUNTER, P.M., 2014. Water , **Electrolytes and Micronutrients Topic 2 Copyright** © by ESPEN LLL Programme 2014.

KRAMER, U.; COTTER-HOWELLS, J. D.; CHARNOCK, J. M.; BAKER, A. J. M.; SMITH, A. C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Lett. Nature**, v. 379, p. 635-638, 1996.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean. **Plant and Soil**, v. 1007, p. 1-15, 2012.

LANZA, M. G. D. B., & DOS REIS, A. R. (2021). Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS scavenging responses against abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.026>

- LEVY, C. B. **Niquel em soja: doses e formas de aplicação**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub Tropical) - Instituto Agronômico de Campinas, ,2013.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, n. 5, p.591-592, 1983.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: **POTAFOS**, 1989, 201p.
- MALAVOLTA, E. & MORAES, M.F. Nickel - from toxic to essential nutrient. **Better Crops**, 91(3):26-27, 2007.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e perspectivas. 2.ed. Piracicaba: **POTAFOS**. p.319. 1997.
- MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica chimica acta**, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.
- MEGDA, M. X. V.; TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; VITTI, A. C. Eficiência agrônômica de adubos nitrogenados em soqueira de cana-de-açúcar colhida sem queima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1681-1690, 2012.
- MILLER G, SUZUKI N, RIZHSKY L, ET AL. Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. **Plant Physiologic**. 2007; 144(4):1777-85.
- MITTLER, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
- MOBLEY, H. L. T.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 1, p. 85-108, 1989.
- MOBLEY, H. L. T.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 451-480, 1995.
- MOLDES, C.A.; MEDICI, L.O.; ABRAHÃO, O.S.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta PhysiologiaePlantarum**, v. 30, p. 469-479, 2008
- MORAES, M. F.; ABREU JUNIOR, C. H. & LAVRES JUNIOR, J. Micronutrientes. In: PROCHNOW, L. I.; CASARN, V. & STIPP, S. R. (Eds.). Piracicaba: **International Plant Nutrition Institute**, v.2. 2010. p.205-278
- OHYAMA, T., OHTAKE, N., SUEVOSHI, K., Ono, Y., TSUTSUMI, K., UENO, M., ... & TAKAHASHI, Y. (2017). Amino acid metabolism and transport in soybean plants. **Amino Acid-New Insights and Roles in Plant and Animal**, 171-196.In tech.

OLIVEIRA, R. DE; DAROS, E.; ZAMBON, J. Área Foliar Em Três Cultivares De Cana-De-Açúcar E Sua Correlação Com a Produção De Biomassa. **Pesquisa**, v. 37, n. 2, p. 71–76, 2007.

OU, B.; HUANG, D.; HAMOSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. (2002), Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 3122-3128.

PENATTI, C. P. Adubação da cana-de-açúcar - 30 anos de experiência. 1. ed. Itu, SP, **Brazil: Editora Ottoni**, 2013. p. 347.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Opinion–Nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. **Plant Science**, v. 199, p. 79-90, 2013.

POLACCO, J.C.; HOLLAND, M.A. Roles of urease in plant cells. **International Review of Cytology** v. 145, p. 65-103, 1993.

RAJAIE, M.; KARIMIAN, N.; YASREBI, J. Nickel transformation in two calcareous soil textural classes as affected by applied nickel sulfate. **Geoderma**, v. 144, p. 344-351, 2008.

REIS, A. R.; RODAK, B. W.; PUTTI, F. F.; MORAES, M. F. Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 1, n. 147, p. 10-24. 2014.

REIS, A.R. **Metabolismo do nitrogênio e estado nutricional do cafeeiro (Coffea arabica)**. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

RIDESA, Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro: **CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES "RB" DE CANA-DE-AÇÚCAR**. Curitiba: [s. n.], 2010. 136 p. v. 1. Disponível em: <http://www.cana.com.br/biblioteca/informativo/catalogo-2010.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2023.

RODAK, B. W. **Níquel em solos e na cultura de soja**. 2014. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SCALABRIN, E.; RADAELLI, M.; CAPODAGLIO, G. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana glauca* plants exposed to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 103, n. 1, p. 53-60, 2016.

SENWO, Z. N.; TAZISONG, I. A. Metal contents in soils of Alabama. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 35, p. 2837- 2848, 2004.

SHIMIZU, N.; HOSOGI, N.; PARK, P. J. Reactive oxygen species (ROS) generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response

to AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. **Journal of Genetic Plant Pathology**, v.72, p.6-15, 2006.

SIEBIELEC, G.; CHANEY, R. L. Manganese fertilizer requirement to prevent manganese deficiency when liming to remediate Ni-phytotoxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, p. 1-17, 2006.

SILVA, A. A.; SILVA, T. S.; VASCONCELOS, A. C. P.; LANA, R. M. Q. Aplicação de diferentes fontes de ureia de liberação gradual na cultura do milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia-MG, v. 28, p. 104-111, 2012.

SILVA, V.M., BOLETA, E.H.M., LANZA, M.G.D.B., LAVRES, J., MARTINS, J.T., SANTOS, E.F., DOS SANTOS, F.L.M., PUTTI, F.F., JUNIOR, E.F., WHITE, P.J., BROADLEY, M.R., CARVALHO, H.W.P. de, REIS, dos, A.R., 2018. Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of selenium toxicity in cowpea plants. **Environ. Exp. Bot.** 150, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.020x>

SINCLAIR, T.R.; HORIE, T. Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. **Crop Science**, v.29, p.90-98, 1989.

SIQUEIRA FREITAS, D., WURR RODAK, B., RODRIGUES DOS REIS, A., DE BARROS REIS, F., SOARES DE CARVALHO, T., SCHULZE, J., ... & GUIMARÃES GUILHERME, L. R. (2018). Hidden nickel deficiency? Nickel fertilization via soil improves nitrogen metabolism and grain yield in soybean genotypes. **Frontiers in plant science**, 9, 614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00614>

SMITH, N.G. & WOODBURN, J. Nickel and ethylene involvement in the senescence of leaves and flowers. **Naturwissenschaften**, 71(4):210-211, 1984.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Translocation in the phloem. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Eds.) **Plant physiology**. 2.ed. **Sunderland: Sinauer Associates**, 1998. p.251-259.

TEZOTTO, T.; FAVARIN, J. L.; AZEVEDO, R. A.; ALLEONI, L. R. F.; MAZZAFERA, P. **Coffee is highly tolerant to cadmium, nickel and zinc: plant and soil nutritional status, metal distribution and bean yield**. *Field Crops Research*, v. 125, p. 24-34, 2012.

THOMAS, R. Practical Guide to ICP-MS: A tutorial for beginners. **CRC Press.**, 2013.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, n. 02, p. 280-283, 1968.

WALKER, C. D.; GRAHAM, R. D.; MADISON, J. T.; CARY, E. E.; WELCH, R. M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiology**, v. 79, p. 474-479, 1985.

WALKER, C. D.; GRAHAM, R. D.; MADISON, J. T.; CARY, E. E.; WELCH, R. M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiology**, v. 79, p. 474-479, 1985.

WHITE, P. J. Long-distance transport in the xylem and phloem. In: MARS-CHNER, P. (Ed.). **Mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. United States of America: Elsevier, 2012. p. 49-70.

WINTER, G., TODD, C. D., TROVATO, M., FORLANI, G., & FUNCK, D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. **Frontiers in plant science**, 6, 534. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00614>

Yemm, E.W.; Cocking, E.C., 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**. 80:209-213.

YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p. 1-17, 2011.

ZHENG, Q.L.; NAKATSUKA, A.; MATSUMOTO, T. & ITAMURA, H. Pre-harvest nickel application to the calyx of 'Saijo' persimmon fruit prolongs postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, 42:98-103, 2006.