

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO EM
CANA-DE-AÇÚCAR

Carlos Leandro Rodrigues dos Santos
Engenheiro Agrônomo

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO EM
CANA-DE-AÇÚCAR

Carlos Leandro Rodrigues dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Maria Saran

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Ciência do Solo).

2013

Santos, Carlos Leandro Rodrigues dos
S237a Atividade da redutase do nitrato em cana-de-açúcar / Carlos
Leandro Rodrigues dos Santos. – – Jaboticabal, 2013
iv, 187 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Jairo Osvaldo Cazetta

Co-orientador: Luciana Maria Saran

Banca examinadora: Milton Ferreira de Moraes, Samira
Domingues Carlin Cavallari, Fábio Oliviere de Nobile, Renato de Mello
Prado

Bibliografia

1. *Saccharum* spp. 2. Adubação nitrogenada. 3. Atividade
enzimática. 4. Metabolismo do nitrogênio. 5. Métodos alternativos. 6.
Nutrição de plantas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.84:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

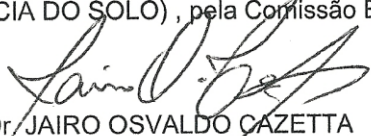
TÍTULO: ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO EM CANA-DE-AÇÚCAR

AUTOR: CARLOS LEANDRO RODRIGUES DOS SANTOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. JAIRO OSVALDO CAZETTA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN

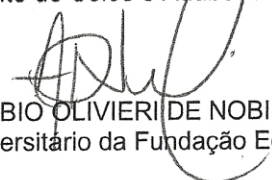
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (CIÊNCIA DO SOLO), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JAIRO OSVALDO CAZETTA
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MILTON FERREIRA DE MORAES
Universidade Federal de Mato Grosso / Barra do Garças/MT


Profa. Dra. SAMIRA DOMINGUES CARLIN CAVALLARI
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / Jaú/SP


Prof. Dr. RENATO DE MELLO PRADO
Departamento de Solos e Adubos / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. FÁBIO OLIVIERI DE NOBILE
Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos / Barretos/SP

Data da realização: 18 de dezembro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Carlos Leandro Rodrigues dos Santos, nascido em Lambari - MG em 19 de maio de 1983. Ingressou em 1999 na Escola Agrotécnica Federal de Machado - MG, onde concluiu, em 2001, o curso de técnico em Agropecuária. Em 2002, entrou para a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde cursou Agronomia, vindo a graduar-se em 2007. Em 2008, iniciou o mestrado no curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ, com apoio do CNPq, sob a orientação da Dra. Veronica Massena Reis e do Dr. Segundo Urquiaga. Desenvolveu a dissertação "Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em sorgo granífero, forrageiro e sacarino". No segundo ano do curso recebeu a bolsa Nota 10 da FAPERJ. Concluiu o curso em 2010. Ainda neste ano, entrou para o curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, em nível de doutorado, na FCAV/UNESP apoiado pela CAPES, vindo a desenvolver, sob a orientação do prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta e Dra. Luciana Maria Saran, pesquisas ligadas a avaliação da atividade da enzima redutase do nitrato em cana-de-açúcar, o que resultou o presente trabalho. Em sua vida acadêmica, atuou como estagiário em algumas instituições, mas a principal atuação foi como bolsista na Embrapa Agrobiologia, de 2004 a 2010, participando como integrante de 3 projetos de pesquisa na área de "Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas não Leguminosas". Foi co-autor de 6 trabalhos publicados em periódicos indexados e 1 comunicado técnico da Embrapa. Participou da publicação de 35 resumos em eventos científicos. Atuou como participante em 26 cursos ligados a agronomia. Participou de 33 eventos científicos. Foi co-autor do projeto "Redução de doses de fertilizante nitrogenado e promoção de crescimento pelo uso de bactérias diazotróficas nas culturas de cana-de-açúcar, milho, sorgo e trigo" premiado na categoria menção honrosa na III edição do "Prêmio Agroambiental Monsanto - Troféu Ernesto Paterniani". Ministrou o minicurso de "Manejo Ecológico de Solos" para estudantes de intercâmbio do Haiti realizado no IFS - campus São Cristóvão - SE. Atuou como professor de Química no "Cursinho Unificado Popular" em Jaboticabal - SP.

Se andarmos apenas por caminhos já
traçados, chegaremos apenas aonde os
outros chegaram.

Alexandre Graham Bell

À Minha mãe Maria Fátima e às minhas
queridas irmãs Patrícia e Gisele.
Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia e Ciência do Solo da FCAV/UNESP - campus de Jaboticabal pela oportunidade.

A Deus, por ter me proporcionado mais uma conquista.

Aos meus pais Antônio Carlos dos Santos e Maria Fátima Rodrigues pela criação. Sem eles não seria quem sou hoje.

Às minhas irmãs Patrícia Rodrigues dos Santos, Gisele Rodrigues dos Santos e Alexandra Helena da Cruz (de coração) aos conselhos e por sempre estarem dispostas a ouvirem meus desabafos.

A todos os familiares.

À Claudênia Ferreira da Silva por me apoiar e estar presente na minha vida.

Ao professor Dr. Jairo Osvaldo Cazetta pela confiança e presente orientação no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os professores que ministraram disciplinas durante o meu processo de doutoramento.

Ao técnico de laboratório José Carlos de Freitas pelo auxílio nas análises químicas.

À professora Dra. Luciana Maria Saran pela participação no estudo.

Aos colegas de laboratório Diego Victoriano de Oliveira, Aluizio Hideki Togoro, Juliana Aparecida dos Santos da Silva, Isaac Silva Martins e Edson Santos da Silva pelas eventuais ajudas com os experimentos.

Aos amigos Rilner Alves Flores, Marcus André Ribeiro Correia, Hélio Lima Santos, Ronaldo Rosa Simões, Leandro Rosatto Moda e Bernardo Nogueira Borges pela ótima convivência e troca de experiências na república Kambuká.

À Flávia Silva Barbosa pela amizade e incentivo.

Aos professores Dr. Adhemar Sanches, Dr. Ely Nahas, Dr. Miguel Angelo Mutton e Dr. Renato de Mello Prado pelas valiosas sugestões durante o exame geral de qualificação do doutorado.

Ao professor Dr. Alan Rodrigo Panosso pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Professor Dr. Samir Issa Samara por ceder a área experimental para a realização das coletas e, ao funcionário Milton de Sousa Siqueira pelas informações a respeito da implantação e condução do canavial utilizado na primeira fase do estudo.

À Pesquisadora da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Jaú (APTA Polo Centro Oeste), Dra. Samira Domingues Carlin Cavallari, pela concessão dos mini-toletes de cana-de-açúcar utilizados em parte do estudo.

Ao professor Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves pelo empréstimo e auxílio no uso do clorofilômetro.

Ao professor Dr. Milton Ferreira de Moraes pelo apoio e sugestões.

À Estação Agroclimatológica Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP - campus de Jaboticabal, que forneceu os dados meteorológicos.

À sociedade, grande financiadora dos meus estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
Agradeço!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão de Literatura	2
1.3 Referências	14
CAPÍTULO 2 – Adaptação do método de determinação da atividade da redutase do nitrato em tecido foliar de plantas de cana-de-açúcar	21
2.1 Introdução	22
2.2 Material e Métodos	24
2.3 Resultados e Discussão	37
2.4 Conclusões	59
2.5 Referências	60
CAPÍTULO 3 – Dinâmica da atividade da redutase do nitrato após adubação nitrogenada de cana-de-açúcar	65
3.1 Introdução	66
3.2 Material e Métodos	69
3.2.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostras de solo)	69
3.2.2 Experimento 2: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita	74
3.2.3 Experimento 3: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por amostra de solo, areia e vermiculita	76
3.3 Resultados e Discussão	77
3.3.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostra de solo)	80
3.3.2 Experimento 2: Avaliações de plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita	86
3.3.3 Experimento 3: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por amostra de solo, areia e vermiculita	91
3.4 Conclusões	99
3.5 Referências	99
CAPÍTULO 4 – Atividade da redutase do nitrato em diferentes cultivares de cana-de-açúcar e sua relação com a nutrição nitrogenada	104
4.1 Introdução	105
4.2 Material e Métodos	107
4.2.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita	107
4.2.2 Experimento 2: Estudo de correlação entre as variáveis obtidas de plantas de cana-de-açúcar de canaviais comerciais	111
4.3 Resultados e Discussão	115
4.3.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita	115

4.3.2	Experimento 2: Estudo de correlação entre as variáveis obtidas de plantas de cana-de-açúcar de canaviais comerciais.....	127
4.4	Conclusões.....	134
4.5	Referências	134
CAPÍTULO 5 – Atividade da redutase do nitrato em cana-de-açúcar submetida a doses de nitrogênio e estudo do método da reativação enzimática.....		140
5.1	Introdução	141
5.2	Material e Métodos.....	143
5.2.1	Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostra de solo).....	143
5.2.2	Experimento 2: Avaliações em plantas cultivadas em substrato areia mais vermiculita.....	150
5.3	Resultados e Discussão.....	152
5.3.1	Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostra de solo).....	156
5.3.2	Experimento 2: Avaliações em plantas cultivadas em substrato areia mais vermiculita.....	162
5.4	Conclusões.....	174
5.5	Referências	175
CAPÍTULO 6 – Implicações.....		180
APÊNDICES.....		181
Apêndice 1 - Detalhamento das condições de análise da aRN otimizadas por Cazetta e Vilella (2004) para <i>Brachiaria radicans</i>		182
Apêndice 2 – Sequência básica (proposta) para análise da atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em folhas de cana-de-açúcar		183
Apêndice 2A - Procedimentos		183
Apêndice 2B - Preparo dos reagentes		184
Apêndice 2C - Curva padrão do nitrito		185
Apêndice 3 – Vista panorâmica da área cultivada com cana-de-açúcar (IACSP93-3046) utilizada para a padronização do método para a determinação da redutase do nitrato. Área localizada ao lado do Setor de Sericicultura da FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP.....		186
Apêndice 4 – Vista geral dos experimentos 1 (A), 2 (B) e 3 (C), descritos no Capítulo 3 e do experimento 1(D) no Capítulo 4.....		187
Apêndice 5 – Vista geral dos experimentos 1 (A) e 2 (B), descritos no Capítulo 5		187

ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO EM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO – Na primeira fase do estudo realizou-se, para cana-de-açúcar, a padronização das condições de determinação da atividade da enzima redutase do nitrato (RN). Além disso, procedeu-se um estudo para a caracterização da sua atividade em plantas da cultura. Na segunda etapa, acompanhou-se, ao decorrer do tempo após a aplicação de N, a variação dos níveis de atividade da RN em plantas de cana-de-açúcar deficientes do nutriente. Observou-se que a atividade da enzima é máxima aos 13 dias após a aplicação e que plantas deficientes em N, independente da fonte nitrogenada usada, apresentam o mesmo comportamento, e ainda, que a resposta enzimática é mais rápida com a aplicação de nitrato de amônio em relação à uréia ou sulfato de amônio. Na terceira fase, comparou-se cultivares de cana-de-açúcar quanto ao nível de atividade da RN e verificou-se sua relação com variáveis produtivas e nutricionais, tanto em condições controladas como no campo. Observou-se que a atividade da RN varia com a cultivar e que existe relação entre a atividade da enzima e o teor de N, e ainda, que teores de nitrato foliar não se associam com a atividade da enzima. Na última fase da pesquisa, estudou-se o efeito da dose de N na atividade da enzima RN. Os resultados sugeriram que em plantas com severa deficiência de N, a atividade da RN é influenciada pela dose. Constatou-se que, devido aos baixos teores de nitrato foliar, não há atividade da RN sem a adição de nitrato no meio reacional e que, a atividade da enzima apresenta boas perspectivas para indicar a nutrição nitrogenada de plantas de cana-de-açúcar, porém, ainda existe a necessidade do estabelecimento de um critério para o diagnóstico.

Palavras-Chave – *Saccharum* spp., adubação nitrogenada, atividade enzimática, metabolismo do nitrogênio, métodos alternativos, nutrição de plantas

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN SUGARCANE

ABSTRACT – In the first phase of the study was held, for sugarcane, the standardization of the conditions for determining the nitrate reductase activity (NR). Furthermore, a study was conducted for characterization of its activity in crop plants. In the second step, we accompanied, over time after N application, the variation in levels of NR activity in sugarcane plant N deficient. It was observed that the enzyme activity is maximal after 13 days of application and in plants deficient in N, independent of the N source used, plants show the same behavior, and that the enzymatic response is faster with the application of ammonium nitrate than urea or ammonium sulfate. In the third phase, we compared sugarcane cultivars in the level of NR activity and was verified its relationship with productive and nutritional variables, under controlled conditions and field. It was observed that NR activity varies with the cultivar and that there is a relationship between the enzyme activity and N content. Also, that the nitrate foliar was not associated with the enzyme activity. In the last phase of the research, we studied the effect of N application in enzyme NR activity. The results suggested that in plants with severe deficiency of N, NR activity is influenced by rate. It was found that due to the low levels of nitrate in the leaf does not occur increase of RN activity without the addition of nitrate in the reaction medium and that enzyme activity shows goods perspectives for indicate nitrogen nutrition of sugarcane plants, however, there is necessity of the establishment of a criterion for the diagnostic.

Keywords – *Saccharum* spp., nitrogen fertilization, enzyme activity, nitrogen metabolism, alternative methods, plant nutrition

1 CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma importante cultura para a economia do país. A recomendação de nitrogênio baseada na quantidade que as plantas de cana-de-açúcar realmente precisam, seria fundamental para evitar perdas na produção por falta do nutriente, ou mesmo, perda de qualidade do produto pelo excesso de nitrogênio (N), reduzindo a contaminação do ambiente e os gastos com fertilizantes, mantendo a mesma produtividade.

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a produtividade final das culturas. Embora a maior parte do nitrogênio seja absorvida pelas plantas na forma de nitrato, para que possa ser utilizado é necessário que o íon seja reduzido à amônia, e então incorporado como composto orgânico. A conversão do nitrato à amônia é constituída por várias etapas, sendo uma delas a redução do nitrato a nitrito, que é dependente da atividade da enzima redutase do nitrato. A estimativa da atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) tem sido utilizada como parâmetro indicativo da resposta fisiológica de várias espécies de plantas adubadas com nitrogênio, mas são escassos trabalhos visando conhecer a dinâmica da atividade da redutase do nitrato em cana-de-açúcar, especialmente no Brasil.

Pesquisas com métodos enzimáticos para fins de avaliação do estado nutricional de plantas tiveram início em Israel. Estes estudos tiveram como proposta inicial, transformar as estimativas enzimáticas em ferramenta para um diagnóstico mais correto e próximo da realidade, principalmente por se tratar da quantificação do íon de interesse em sua forma metabolicamente ativa, o que seria de grande contribuição para determinar o estado nutricional e a recomendação de adubação em plantas.

Contudo, devido a limitações do método e o difícil controle dos inúmeros fatores que interferem na atividade enzimática, de forma geral, sua aplicabilidade ainda hoje é restrita à pesquisas. Portanto, não é comum se referir à técnica em

ambientes produtivos. O método é bastante interessante por não necessitar do uso de padrões pré-estabelecidos, como acontece atualmente na diagnose pelos teores foliares totais dos nutrientes. Assim, a hipótese de que no futuro as estimativas enzimáticas venham a tornarem-se ferramentas que possibilitem a tomada de decisão, em relação à nutrição mineral de plantas, não deve ser descartada.

Neste contexto, o objetivo da pesquisa foi estudar a atividade da RN em plantas de cana-de-açúcar e verificar a possibilidade do uso da estimativa da atividade da enzima como indicador do estado nutricional em nitrogênio para a cultura.

1.2 Revisão de Literatura

Importância econômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L.) faz parte do comércio, desde a época da colonização pós-descobrimento do Brasil, como descrito na abordagem de fatos históricos da cultura relatados por Figueiredo (2011). Atualmente é vista como a principal matéria prima para a produção de biocombustíveis renováveis no mundo (MILLER, 2010). O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial e apresentou, na safra do ano de 2013, uma área de 8,9 milhões de hectares plantados (CONAB, 2013). Nesta safra foram moídas 589 milhões de toneladas, o que gerou uma produção total próxima a 24 bilhões de litros de álcool e 296 milhões de toneladas de açúcar (CONAB, 2013).

É uma cultura estratégica para a economia do país pelo complexo industrial que depende do setor sucroalcooleiro. Este setor representa cerca de 2% do PIB nacional e fatura mais de US\$ 28 bilhões de dólares, além de gerar aproximadamente um milhão de empregos diretos (SOUSA; MACEDO, 2010). Como qualquer outra cultura econômica, existe a necessidade de aplicação de insumos agrícolas, e principalmente a aplicação de fertilizantes, destacando-se o N pelo elevado custo e grande dinamismo nas plantas e meio ambiente agrícola.

Adubação nitrogenada na cultura da cana-de-açúcar

O estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro de cana-de-açúcar. Atualmente, no estado, a adubação nitrogenada da cultura é feita baseada nas recomendações indicadas por Raij et al. (1997). Em cana-planta é recomendada a aplicação de 30 kg ha⁻¹ de N no plantio, independente da produtividade esperada, e mais 30 a 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura dentro dos primeiros dois meses da brotação (março-abril) ou no final do período chuvoso. Para a cana-soca, as doses variam em função da produtividade esperada. Onde, para produtividades entre 80 e 100 t ha⁻¹ de colmos, recomenda-se 100 kg ha⁻¹ de N em cobertura e acima desta faixa, 120 kg ha⁻¹.

Na mesma publicação Raij et al. (1997) citam o uso da análise química foliar como ferramenta para avaliar o estado nutricional da cultura. Descrevem que, para a amostragem de folhas deve-se coletar 30 folhas do tipo +1 de plantas na fase de maior desenvolvimento vegetativo e afirmam que teores entre 18 e 25 g kg⁻¹ de N estão adequados. Contudo, chamam a atenção e descrevem limitações da técnica e concluem que ainda não é usual, por diversos fatores incontrolláveis, mas que serve como um indicador da necessidade de adubação nitrogenada para a cultura. Neste mesmo segmento, a diagnose foliar, para N, em cana-de-açúcar, é recomendada também por Malavolta (2006), porém a recomendação de amostragem de folhas é um pouco diferente. Onde, em cana-planta, 4 a 6 meses depois da germinação, deve se coletar de 20 a 30 folhas do tipo +3, por talhão uniforme. Já em cana-soca, coletar precisamente aos 4 meses depois da brotação. A cultura estará nutrida adequadamente se o nível de N foliar se encontrar de 19 a 21 g kg⁻¹ (MALAVOLTA, 2006).

Raij e Cantarella (1997) citam que uma tonelada de colmos extrai do solo 0,9 kg de N, o que está de acordo com o apresentado na publicação de Malavolta (2006). Todavia, este autor acrescenta que, uma tonelada de folha extrai 2,4 kg de N do solo.

Com a mudança do sistema de colheita de cana-de-açúcar com despalha a fogo, para o sem queima (cana-crua), o que poderá influenciar o manejo da adubação nitrogenada na cultura, é possível, num futuro próximo, que estes valores

recomendados sejam alterados. Várias pesquisas já foram realizadas para melhor conhecimento e entendimento deste aspecto (BASANTA et al., 2003; COSTA; VITTI; CANTARELLA, 2003; GAVA et al., 2003; VITTI et al., 2007; PRADO; PANCELLI, 2008; VITTI et al., 2008b; VITTI et al., 2011).

A palhada da cana-de-açúcar apresenta teores de 3 a 30% de nitrogênio, contudo, a disponibilidade não é imediata devido a baixa taxa de mineralização (VITTI et al., 2008a), entretanto, com o passar do tempo, a palhada se mineraliza e libera o N dos seus tecidos, com isto, é possível que a adubação nitrogenada possa ser reduzida.

A disponibilidade de N para as raízes é um fator decisivo para o crescimento de plantas (HAWKESFORD et al., 2012). Vale et al. (2011) constataram que o N e o P foram os nutrientes que mais limitaram o crescimento de plantas cultivadas em solução nutritiva, porém, tanto o excesso de nitrogênio, como a deficiência do mesmo, causa impactos negativos na produção e na qualidade do caldo da cana-de-açúcar (VITTI et al., 2008a). Além disso, a recuperação de N proveniente do fertilizante em cana-de-açúcar, segundo vários autores citados por Cantarella (2007) e Vitti et al. (2008a), varia de 7 a 63% portanto, grande parte do N aplicado não é aproveitado pelas plantas. Por isso, é importante pesquisas que visem à otimização das recomendações e a economia de fertilizantes, pois o N é o nutriente que mais onera o custo de produção da cana-de-açúcar e o manejo correto é de suma importância.

Metabolismo do nitrogênio em cana-de-açúcar

Depois do carbono, o nitrogênio é o nutriente mais requerido pelas plantas (1 a 5% da matéria seca) e participa como constituinte de proteínas, ácidos nucléicos, clorofila, coenzimas, fito-hormônios e metabólitos secundários (HAWKESFORD et al., 2012).

De modo geral, para que uma planta seja nutrida por nitrogênio, este precisa estar nas formas iônicas NO_3^- ou NH_4^+ , principalmente, sendo a absorção feita por proteínas específicas, chamadas “transportadores”, que podem apresentar alta ou

baixa afinidade pelos substratos (NO_3^- e NH_4^+) em função da concentração no meio (MILLER; CRAMER, 2004; SOUZA et al., 2006; SOUZA; FERNANDES, 2006).

Em solos bem drenados tropicais, como é o caso da maioria dos solos brasileiros, a disponibilidade do íon NO_3^- é bem maior que a do íon NH_4^+ . Isto em função, principalmente, dos menores valores de pH, que influenciam a atividade da microbiota natural sobre a mineralização da matéria orgânica, fonte principal de N, além de exercer efeito direto, pois pH baixo diminui a absorção de cátions (MALAVOLTA, 2006). Com isso, o predomínio da absorção de nitrato pelas plantas mesmo que, em condições de similaridade nas concentrações de ambas as formas iônicas, as plantas de cana-de-açúcar apresentem preferência pelo íon amônio que pelo nitrato (ROBINSON et al., 2011). Este fato pode estar ligado a maior afinidade dos transportadores por este íon ou, ainda, porque o amônio é absorvido por canal iônico, sem gasto energético direto e o transporte transmembrana do nitrato requer energia (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000; PRADO, 2008).

Geralmente em plantas anuais, a maioria do nitrato absorvido é transportada da raiz sem gasto de energia pelo xilema para a parte aérea das plantas (PRADO, 2008). A cana-de-açúcar é considerada semi-perene em função do número de “cortes” que proporciona. Contudo, tecidos foliares apresentam altas atividades da RN, comparados a colmos e raízes (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967). Portanto, a redução assimilatória ocorre principalmente nas folhas, conforme ocorre em plantas anuais.

O nitrato não se acumula em plantas de cana-de-açúcar. Várias pesquisas sugerem que é prontamente metabolizado ao chegar às células dos tecidos foliares (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967; SILVEIRA; CROCOMO, 1990; ISHIKAWA et al., 2009; ROBINSON et al., 2011). Uma vez no interior do citoplasma, é reduzido a nitrito, em seguida a amônio que se dissocia e forma amônia e é incorporado nos esqueletos de carbono provenientes da fotossíntese, resultando na formação dos aminoácidos necessários à síntese de enzimas e proteínas (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

No processo de incorporação do N nas plantas, as principais enzimas catalizadoras das reações são a redutase do nitrato (RN), que é a primeira enzima a atuar no nitrato absorvido (CAMPBELL, 1999; TISCHNER, 2000), e a glutamina

sintetase (GS), que fixa rapidamente o amônio no glutamato, formando a molécula de glutamina (UNNO et al., 2006). A redistribuição do nitrogênio das folhas velhas para as mais jovens se dá pelo floema, principalmente nas formas de glutamina e asparagina (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Contudo, por ser possível a ocorrência de fixação biológica de N em cana-de-açúcar, o nutriente pode ser remobilizado através de outras formas, porém isto é pouco conhecido (REIS et al., 2006).

A enzima redutase do nitrato

De modo geral, enzimas são fundamentais para que ocorra o aumento da velocidade das reações bioquímicas (NELSON; COX, 2004). A redutase do nitrato é a enzima que facilita, nos sistemas biológicos, a conversão do íon nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-).

Existem basicamente quatro tipos de redutases do nitrato (RN). Sendo que três delas são bacterianas [RN assimilatórias citoplasmáticas (Nas), RN respiratórias (Nar) e RN periplasmáticas dissimilatórias (Nap)] e uma é eucariótica [RN assimilatórias eucarióticas (Euk-NR)]. A estrutura molecular e genética dos diferentes tipos de RNs apresentam peculiaridades que foram bem retratadas nas revisões de Gonzalez et al. (2006) e Morozkina e Zvyagilskaya (2007). Mais detalhes sobre classificação das redutases do nitrato podem ser encontrados em bancos de dados disponível *online*, como os sites: <http://enzyme.expasy.org/> e <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>, por exemplo.

Desde a década de 60, se tem conhecimento da presença de NR assimilatórias eucarióticas nos citoplasmas das células de cana-de-açúcar (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967). Portanto, quando for mencionado RN há de se entender que trata-se da Euk-NR.

Não poderia deixar de comentar, que das revisões sobre o tema “Redutase do nitrato”, publicadas até então, destaca-se a de Beevers e Hageman (1969) intitulada de “Redutase do Nitrato em Plantas Superiores”, que se tornou citação clássica após 10 anos da publicação.

Esta enzima é a primeira da via de incorporação do íon nitrato nas plantas superiores (BEEVERS; HAGEMAN, 1969). Sua redução constitui na etapa limitante e reguladora deste processo e representa um papel fundamental na nutrição nitrogenada, e consequentemente no crescimento e na produtividade dos vegetais (SOUZA; STARK; FERNANDES, 2002; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010, MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012).

A Redutase do nitrato é uma denominação geral de um complexo enzimático composto por duas unidades idênticas e cada uma apresenta três grupos prostéticos, o FAD, o heme e a Molibdopterina (CAMPBELL, 1999).

Para que ocorra o processo catalítico, primeiramente o grupo FAD (flavina adenina dinucleotídeo) recebe poder redutor, na forma de dois elétrons, da coenzima NADH e/ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) (TISCHNER, 2000). Em tecidos fotossintetizantes, o poder redutor requerido para a atividade da NR parece ser derivado do NADPH produzido nos cloroplastos pela etapa luminosa da fotossíntese e o NADH citossólico da oxidação de açúcares na via glicolítica (SOUZA; STARK; FERNANDES, 2002).

O grupo heme é responsável pelo repasse dos elétrons para o cofator Molibdopterina, que é o centro ativo da enzima, ou seja, onde o NO_3^- recebe os elétrons para então se reduzir a NO_2^- (CRAWFORD et al., 2000). O repasse dos elétrons acontece de acordo com a reação: $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+ + \text{NO}_3^- \rightleftharpoons \text{NAD(P)}^+ + \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ (KAISER; WEINER; HUBER, 1999).

A RN é regulada por uma série de estímulos ambientais e intrínsecos à planta, que regulam os mecanismos transcripcional, traducional e pós-traducional (CAMPBELL, 1999; KAISER; WEINER; HUBER, 1999).

O molibdênio apresenta a função de constituinte da enzima, portanto, é fundamental para a redução assimilatória do nitrato. Porém, a sua disponibilidade às plantas não é problema em solos agrícolas brasileiros, pois com a calagem ocorre a elevação do pH, e com isto, as hidroxilas (OH^-) deslocam MoO_4^{2-} dos sítios de troca de superfície dos coloides da fase lábil (MALAVOLTA, 2006), o que aumenta a disponibilidade do nutriente.

O desencadeamento da expressão dos genes da RN é induzido pela presença de nitrato, enquanto o nível de expressão é controlado pela luz (SOUZA;

STARK; FERNANDES, 2002). Em *Arabidopsis thaliana*, que é a planta modelo para estudos genéticos, os genes envolvidos com a codificação da RN são os *NIA1* e, em maior quantidade (90%) o *NIA2*, sendo que o RNA mensageiro (RNAm-RN) tem a sua transcrição induzida pelo nitrato (KONISHI; YANAGISAWA, 2011), mas não é um pré-requisito absoluto para a expressão do gene (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012). Contudo, o nitrato não exerce efeito sobre a tradução da RN (TISCHNER, 2000). O nível de RNAm-RN é influenciado também em resposta ao ciclo de luz e escuro (LILLO, 2008), além de responder a outros sinais ligados ao próprio metabolismo do N (teor de glutamina), metabolismo do carbono (sucrose, CO₂) e fotossíntese (energia e citocininas) (CRAWFORD et al., 2000; TISCHNER, 2000; MILLER; CRAMER, 2004; KAISER; WEINER; HUBER, 1999).

A grande responsável pelo controle pós-traducional da atividade da redutase do nitrato em plantas é a proteína de transdução de sinal 14-3-3, já identificada em cana-de-açúcar (KURAMAE; FENILLE; ROSA, 2001). O controle acontece da seguinte forma: Nas junções entre os grupos prostéticos da enzima, mais especificamente em um resíduo de serina, pode ocorrer a fosforilação, seguida da ligação da proteína 14-3-3. Esta proteína controla rapidamente, de forma reversível, a atividade da redutase do nitrato em resposta à luminosidade ou à escuridão. Portanto, no escuro, a proteína 14-3-3 se liga ao fosfato do resíduo de serina e inativa a enzima. Por outro lado, se as plantas forem expostas à luz novamente ocorre o desligamento da proteína 14-3-3 e a enzima torna-se ativa novamente (CRAWFORD et al., 2000; SOUZA; STARK; FERNANDES, 2002; LEA et al., 2006).

O nível de atividade da enzima em tecidos de plantas é bastante influenciado pelo substrato da RN, que é o íon NO₃⁻ (BEEVERS; HAGEMAN, 1969). Por isso, a concentração de nitrato é um importante controlador da atividade. Essa atividade é controlada também pelas condições ambientais e intrínsecas da planta, como temperatura do ar, luminosidade, balanço hídrico da planta, propriedades químicas do meio de cultivo (pH, teor de Al, relação C/N, teor de nutrientes, teor de NH₄⁺) e idade fisiológica dos tecidos vegetais (SRIVASTAVA, 1980; SILVEIRA; CROCOMO, 1990; VALCHERET; CABOCHE, 1995; SHARMA; DUBEI, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006; LEA et al., 2006; LILLO, 2008; FRESCHI et al., 2009; CRUZ et al., 2011; BOBADE; KHYADE, 2012; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012). Alguns fatores

como os excessos de frio, calor, salinidade e concentrações de metais pesados podem reprimir a atividade da redutase do nitrato por causar alterações das propriedades e estrutura da RN (MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012). Além disso, existem outros mecanismos de controle ainda não elucidados (KONISHI; YANAGISAWA, 2011).

Método para a estimativa da atividade da redutase do nitrato

A atividade da RN pode ser determinada pelo método *in vitro* ou *in vivo*. O método *in vitro* apresenta como desvantagem a necessidade de extração da enzima e, por isso, é mais laborioso. Já o *in vivo*, pode ser usado mais facilmente sem a extração da enzima, porém apresenta como desvantagem a necessidade de se adaptar as condições de realização do ensaio, conforme a natureza do tecido vegetal.

O método *in vivo* para a determinação da atividade da redutase do nitrato (aRN) em tecidos intactos de plantas foi criado por Mulder, Boxma e Veen van (1959). Tais autores estudavam a capacidade de redução de nitrato em hortaliças deficientes de molibdênio e nitrogênio. Com o passar do tempo, várias modificações foram realizadas com finalidade de tornar o método menos laborioso. Com isto, Jaworski (1971) definiu a metodologia que geralmente é referenciada hoje em dia.

No processo de análise da atividade da RN o meio reacional é composto basicamente por solução tampão, KNO_3 , solvente e/ou detergente (JAWORSKI, 1971) e cada espécie de planta tem suas particularidades anatômicas e/ou fisiológicas, o que faz com que seja necessário o estabelecimento de condições apropriadas para cada espécie em estudo.

Métodos diagnósticos para avaliação do estado nutricional em nitrogênio para plantas

Não existe, ainda, um critério totalmente confiável de recomendação da adubação nitrogenada com base na análise química do solo (CANTARELLA, 2007; VITTI et al., 2008a; RAIJ, 2011). Por isso, há necessidade do desenvolvimento de

testes complementares. O diagnóstico pelos sintomas visuais pode ser impreciso, além de que identifica a deficiência somente depois que a produção já está comprometida (PRADO, 2008; MALAVOLTA, 2006). A análise química foliar fornece os teores de N total nas folhas possibilitando a comparação com as faixas de suficiência e é uma ferramenta muito útil para diagnosticar o estado nutricional de culturas, mas também tem as suas limitações e não deve ser empregada de forma isolada (BAR-ANKIVA; STERNBAUM, 1965; RAIJ; CANTARELLA, 1997; MALAVOLTA, 2006; CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010).

Existe também a possibilidade de se obter diagnósticos do estado nutricional em N por alguns métodos alternativos. A determinação indireta da clorofila é um deles, pois o teor de clorofila em folhas geralmente se correlaciona com o teor de N. Assim, é possível inferir se as plantas necessitam ou não de adubação nitrogenada (MALAVOLTA, 2006; GODOY; SOUZA; VILLAS BOAS, 2010; AMARAL; MOLIN, 2011). Além deste, existem outros testes pouco comuns como as técnicas de infiltração, bioavaliação, refletância, escala de cores, teste no tecido e análise de toque ("Spot tests"), citados por Malavolta (2006), e ainda, análise da concentração de N-NO_3^- na seiva e em flores (MARTINEZ et al., 2003; FERREIRA; FONTES, 2011).

Quanto aos métodos bioquímicos, é possível determinar os níveis de aminoácidos, como os da asparagina, prolina, glutamina e cisteína, por exemplo, pois a deficiência de N pode provocar variação nos teores destes compostos do metabolismo intermediário. Segundo Malavolta (2006), nota-se a diminuição do teor dos aminoácidos asparagina, prolina e glutamina e o aumento do teor de cisteína, cuja acumulação significa que não entrou na síntese de moléculas de proteínas, ficando na forma livre. Com isso, pode-se também inferir sobre o estado nutricional em nitrogênio das plantas, mas salienta-se que o uso tem sido apenas para fins científicos, ainda.

O uso da estimativa da RN como teste diagnóstico, conforme a técnica da "Reativação enzimática" proposta por Bar-ankiva e Sternbaum (1965), pode auxiliar, de forma rápida, na identificação de deficiências nutricionais, com diagnósticos mais próximos da realidade, uma vez que o nitrogênio será analisado indiretamente em sua forma metabolicamente ativa.

A análise da atividade da RN é muito mais simples e pouco dispendiosa, tanto se tratando de praticidade, como por questões ambientais, pois o método Kjeldahl, geralmente utilizado na determinação de N total é bom, mas gera vapores tóxicos e resíduos de metais pesados. Existe ainda a possibilidade da realização de análises diretamente no campo com resultados rápidos, como no estudo de Villalobos e Carvajal (1978) que, propõe uma carta colorimétrica para estimar, fora do laboratório, o nível da enzima em folhas de algumas culturas.

Outra vantagem seria a possibilidade do desenvolvimento de testes rápidos, como “Kits” baseados nas repostas bioquímicas das plantas (CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010). Uma alternativa seria testes bioquímicos com modernos biossensores, capazes de proporcionar estimativas instantâneas (VELASCO-GARCIA; MOTTRAM, 2003; BOO; TRESSEL; JO, 2007; COOK; ARENAS; APONTE, 2009; SALOME et al., 2009; CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010), o que indicaria o estado nutricional da cultura no exato momento da medida, possibilitando uma imediata tomada de decisão.

Atividade da RN como indicadora do estado nutricional de plantas

Os estudos da possibilidade do uso da atividade enzimática em tecidos vegetais, como indicadora do estado nutricional de plantas, foram bastante difundidos em periódicos importantes nas décadas de 60 e 70 (BAR-AKIVA, 1961; BAR-AKIVA; STERBAUM, 1965; SHAKED; BAR-AKIVA, 1967; BAR-AKIVA; SAGIV; LESHEM, 1970; JOHNSON; WHITTINGTON; BLACKWOOD, 1976). Estas pesquisas foram desenvolvidas principalmente por um grupo liderado pelo pesquisador israelense Dr. Avigdor Bar-Akiva, importante nome da nutrição mineral de plantas, digno de ter a sua biografia acadêmica publicada no periódico “Journal of Plant Nutrition” (LAVON; JONES JR., 1988). Seus estudos contribuíram muito para o avanço das pesquisas com métodos enzimáticos para a avaliação do estado nutricional de plantas, sendo citados atualmente em publicações internacionais importantes (RÖMHELD, 2012).

O princípio do método, proposto pelo grupo, era que, ao se proceder a análise de amostras coletadas da mesma folha, porém, uma parte, sem a adição do

nutriente a ser diagnosticado (atividade endógena) e, a outra parte com o nutriente presente no meio reacional (atividade induzida), se obteria uma diferença entre as duas determinações denominada de “Reativação enzimática”. Assim, quanto menor a diferença, hipoteticamente as plantas estariam mais bem nutridas e sem a necessidade de comparação com padrões pré-estabelecidos como ocorre na diagnose por meio de teores foliares totais, o que, segundo os próprios pesquisadores, pode representar melhor o estado nutricional da planta por ser capaz de distinguir a fração metabolicamente ativa do nutriente (BAR-AKIVA; STERBAUM, 1965).

Desde a proposta do método, uma série de resultados de pesquisas com métodos diagnósticos enzimáticos já foram obtidos. Na revisão de Lavon e Goldschmidt (1999), os autores fizeram um apanhado geral de trabalhos científicos mais importantes para esta área do conhecimento e relataram alguns casos de sucesso, principalmente em relação a detecção de deficiência de micronutrientes em plantas.

Especificamente, no caso da enzima RN, Lavon e Goldschmidt (1999) citaram, além do nitrogênio, a possibilidade do cálcio e do molibdênio serem também diagnosticados pela estimativa da aRN. Recentemente, trabalhos como o de Bobade e Khyade (2012), em pesquisas com plantas de amora, verificaram que alguns nutrientes como o molibdênio, magnésio e zinco podem exercer efeito na atividade da enzima por apresentarem funções de constituintes ou ativadores enzimáticos. Além disso, em estudo do efeito da interação do enxofre com o nitrogênio na planta medicinal *Ammi majus*, Ahmad et al. (2010) observaram que a aRN pode ser influenciada, também, pelo efeito da interação entre os nutrientes. Portanto, existe um “leque” de assuntos para se estudar futuramente.

Mais recentemente, Cazetta, Fonseca e Prado (2010), também abordaram o assunto “Métodos diagnósticos enzimáticos” em sua revisão, e afirmaram que o diagnóstico por meio da atividade de enzimas apresenta boas perspectivas futuras, apresentando algumas vantagens em relação às técnicas convencionais, mas, também apontaram as dificuldades para a aplicação do método. Com isto, ainda existe a necessidade de mais estudos para a minimização dos impasses atuais.

No que diz respeito à avaliação da nutrição nitrogenada com métodos enzimáticos, alguns trabalhos evidenciaram a possibilidade de utilização da estimativa da atividade da enzima RN como indicadora das exigências de N para plantas de citros, tomate, café e algumas forrageiras (BAR-AKIVA; STERBAUM, 1965; BAR-AKIVA; SAGIV; LESHEM, 1970; VILLALOBOS; CARVAJAL, 1977; SCHEURWATER et al., 2002). Lemaître et al. (2008) confirmaram no periódico “Plant Cell Physiology” que o método enzimático pode ser usado como ferramenta para identificar problemas nutricionais relativos a nitrogênio em *Arabidopsis thaliana*. Neste mesmo sentido, em estudos preliminares com cana-de-açúcar, autores como Villalobos e Carvajal (1977) e, Abayomi, Etejere e Fadayomi (1988) preconizaram em seus estudos que a atividade potencial da RN, poderia, por meio da magnitude da inducibilidade da enzima, medir a capacidade das plantas utilizarem o nitrato proveniente do solo, além de servir como indicadora do estado nutricional de N.

O estudo de Bar-Akiva, Sagiv, Leshem (1970) foi primordial para o desenvolvimento das pesquisas com o método da “Reativação enzimática”, que se sucederam para gramíneas, inclusive para o presente estudo. Foi o primeiro relato na literatura internacional da aplicação do método para a família botânica *Poaceae*. Na época, os resultados obtidos permitiram que os autores afirmassem que a taxa de resposta à indução da atividade da RN, pela adição do substrato (nitrato), é negativamente correlacionada com as quantidades de N aplicadas e consequentemente com a produção, ou seja, quanto mais alta a relação entre atividade da RN induzida (aRN_i) e a endógena (aRN_e), mais deficiente em N as plantas estariam. Portanto, permitiu prever que a cultura estaria necessitando de adubação nitrogenada.

Em se tratando de cana-de-açúcar, muitas dúvidas ainda não estão esclarecidas em relação à nutrição nitrogenada. A atividade da RN poderia servir como uma ferramenta complementar no diagnóstico, auxiliando na recomendação de fertilizantes nitrogenados.

Em ambientes tropicais, como é o caso das principais regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil, o método da reativação enzimática seria interessante, pois o nitrato é a forma química mais disponível nestes solos.

1.3 Referências

ABAYOMI, Y. A.; ETEJERE, E. O.; FADAYOMI, O. Effect of nitrogen level and water deficit on nitrate reductase activity NRA from leaves of two sugarcane cultivars - Co 957 1001. **Turrialba**, San Jose, v. 38, n. 4, p. 352-358, 1988.

AHMAD, S.; FAZILI, I. S.; HAQUE, R.; KHAN, S. N.; ABDIN, M. Z. Standardization and estimation of nitrate reductase activity in the leaves of *Ammi majus* L. (*Bishops weed*) in relation to sulphur deficiency and seed yield. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 7, p. 515-522, 2010.

AMARAL, L. R.; MOLIN, J. P. Sensor óptico no auxílio à recomendação de adubação nitrogenada em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1633-1642, 2011.

BAR-AKIVA, A. Biochemical indications as a means of distinguishing between iron and manganese deficiency symptoms in citrus plants. **Nature**, London, v. 190, n. 4776, p. 647-648, 1961.

BAR-AKIVA, A.; SAGIV, J.; LESHEM, J. Nitrate reductase activity as an indicator for assessing the nitrogen requirement of grass crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 405-407, 1970.

BAR-AKIVA, A.; STERBAUM, J. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as a measure of the nitrogen requirement in citrus trees. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 6, n. 3, p. 575-577, 1965.

BASANTA, M. V.; DOURADO-NETO, D.; REICHARDT, K.; BACCHI, O. O. S.; OLIVEIRA, J. C. M.; TRIVELIN, P. C. O.; TIMM, L. C.; TOMINAGA, T. T.; CORRECHEL, V.; CÁSSARO, F. A. M; PIRES, L. F.; MACEDO, J. R. Management effects on nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brazil **Geoderma**, Amsterdam, v. 116, n. 1-2, p. 235-248, 2003.

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

BOBADE, S. N.; KHYADE, V. B. Influence of inorganic nutrients on the activity of enzyme, nitrate reductase in the leaves of mulberry, *Morus alba* (L) (M-5 variety) **Research Journal of Recent Sciences**, Indore, v. 1, n. 5, p. 14-21, 2012.

BOO, Y. C; TRESSEL, S. L.; JO, H. An improved method to measure nitrate/nitrite with an NO-selective electrochemical sensor. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 16, n. 2, p. 306-312, 2007.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 277-303, 1999.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ V., V. H., BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Viçosa, 2007. cap. 7. p. 375-470.

CAZETTA, J. O.; FONSECA, I. M.; PRADO, R. M. Perspectivas de uso de métodos diagnósticos alternativos: testes bioquímicos. In: PRADO, R. M.; CECILIO FILHO, A. B.; CORREIA, M. A. R.; PUGA, A. P. **Nutrição de plantas: diagnose foliar em hortaliças**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV/FAPESP/CAPES/FUNDUNESP, 2010. cap. 6. p. 109-134.

COCK, L. S.; ARENAS, A. M. Z.; APONTE, A. A. Use of enzymatic biosensors as quality indices: A synopsis of present and future trends in food industry. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 69, n. 2, p. 270-280, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2012/13 – quarto levantamento – Abril/2013**. Brasília: CONAB, 2013. 19 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_30_34_boletim_cana_portugues_abril_2013_4o_lev.pdf>. Acesso em: 14 maio 2013.

COSTA, M. C. G.; VITTI, G. C. CANTARELLA, H. Volatilização de N-NH₃ de fontes nitrogenadas em cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 631-637, 2003.

CRAWFORD, N. M.; KAHN, M. L.; LEUSTEK, T.; LONG, S. R. Nitrogen and sulfur. In: BUCHANAN, W.; GRUÍSSEM, R. JONES, R. **Biochemistry e Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 16. p. 786-849.

CRUZ, F. J. R.; LOBATO, A. K. S., COSTA, R. C. L.; LOPES, M. J. S.; NEVES, H. K. B.; OLIVEIRA NETO, C. F.; SILVA, M. H. L.; SANTOS FILHO, B. G.; LIMA JUNIOR, J. A.; OKUMURA, R. S Aluminum negative impact on nitrate reductase activity, nitrogen compounds and morphological parameters in sorghum plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 641-645, 2011.

FERREIRA, M. M. M.; FONTES, P. C. R. Índices de nitrogênio nas folhas de tomateiro em função do nitrogênio e da adubação orgânica. **Revista Agro@mbiente On-line**, Boa Vista, v. 5, n. 2, p. 106-112, 2011.

FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; SCARPARI, M. S.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A. **O instituto agrônomo (IAC) e fatos históricos relacionados ao desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar até o fim do século XX**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2011. 47 p. (documentos IAC, 103).

FRESCHI, L.; NIEVOLA, C. C.; RODRIGUES, M. A. R.; DOMINGUES, D. S.; VAN SLUYS, M. A.; MERCIERA, H. Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, n. 3, p. 201-212, 2009.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, M. W. Recuperação do nitrogênio (^{15}N) da uréia e da palhada por soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 621-630, 2003.

GODOY, L. J. G.; SOUZA, T. R. VILLAS BOAS, R. L. Perspectivas de uso de métodos diagnóstico alternativos: análise da seiva e medida indireta da clorofila. In: PRADO, R. M.; CECILIO FILHO, A. B.; CORREIA, M. A. R.; PUGA, A. P. **Nutrição de plantas: diagnose foliar em hortaliças**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV/FAPESP/CAPES/FUNDUNESP, 2010. v. 1. p.135-187.

GONZALEZ, P. J.; CORREIA, C.; MOURA, I.; BRONDINO, C. D.; MOURA, J. J. Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 100, n. 5-6, p 1015-1023, 2006.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MØLLER, I. S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2012. cap. 6. p. 135-189.

ISHIKAWA, S.; ANDO, S.; SAKAIGAICHI, T.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate-N concentration of sugarcane, **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 55, n. 4, p. 485-495, 2009.

JOHNSON, C. B.; WHITTINGTON, W. J.; BLACKWOOD, G. C. Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield. **Nature**, London, v. 262, n. 5564, p.133-134, 1976.

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

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA1, in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 52, n. 5, p. 824-836, 2011.

KURAMAE, E. E.; FENILLE, R. C.; ROSA, V. E. Identification of 14-3-3-like protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 43-48, 2001.

LAVON, R.; GOLDSCHMIDT, E. E. Enzymatic methods for detection of mineral element deficiencies in citrus leaves: a mini-review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, n. 1, p. 139-150, 1999.

LAVON, R.; JONES JR., B. *In memoriam*. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 11, n. 12, p. 3-5, 1988.

LEA, U. S.; LEYDECKER, M. T.; QUILLERÉ, I.; MEYER, C.; LILLO, C. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence, **Plant Physiology**, Waterbury, v. 140, n. 3, p. 1085-1094, 2006.

LEMAÎTRE, T.; GAUFICHON, L.; BOUTET-MERCEY, S.; CHRIST, A.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija Accession. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 7, p. 1056-1.65, 2008.

LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. **Biochemical Journal**, London, v. 415, n. 1, p. 11-19, 2008.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARETZKI, A.; CRUZ, A. D. Nitrate reductase in sugarcane tissues, **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 8, n. 4, p. 605-611, 1967.

MARTINEZ, H. E. P.; SOUZA, R. B.; BAYONA, J. A.; ALVAREZ V., V. H.; SANZ, M. Coffee-tree floral analysis as a mean of nutritional diagnosis. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, n. 7, p. 1467-1482, 2003.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture, **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 7, p. 1141-1157, 2010.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Sofia, v. 1, n. 3, p. 386-414, 2012.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 4, p. 1-36, 2004.

MILLER, S. A. Minimizing land use and nitrogen intensity of bioenergy. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3932-3939, 2010.

MOROZKINA, E. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate reductases: structure, functions, and effect of stress factors. **Biochemistry**, Moscow, v. 72, n. 10, p. 1151-1160, 2007.

MULDER, E. G.; BOXMA, R.; VEEN VAN., W. L. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissues, **Plant and Soil**, Netherlands, v. 10, n. 4, p. 335-355, 1959.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. In: _____ (Ed.). **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Worth, 2004. cap. 6. p. 190-237.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**, São Paulo: Editora Unesp, 2008. 407 p.

PRADO, R. M.; PANCELLI, M. A. Resposta de soqueiras de cana-de-açúcar à aplicação de nitrogênio em sistema de colheita sem queima. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 951-959, 2008.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. 420 p.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. rev. Campinas: IAC, 1997. 285 p. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. p. 231-244. (Boletim Técnico, 100).

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.153-174.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019045>>. Acesso em: 15 maio 2013.

RÖMHELD, V. Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. In: MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2012. cap. 11. p. 299-312.

SALOME, J. P.; AMUTHA, R.; JAGANNATHAN, P.; JOSIAH, J. J. M.; BERCHMANS, S.; YEGNARAMAN, V. Electrochemical assay of the nitrate and nitrite reductase activities of *Rhizobium japonicum*. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3487-3491, 2009.

SCHEURWATER, I.; KOREN, M.; LAMBERS, H.; ATKIN, O. K. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing Grass species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 374, p. 1635-1642, 2002.

SHAKED, A.; BAR-AKIVA, A. Nitrate reductase activity as an indication of molybdenum level and requirement of citrus plants. **Phytochemistry**, New York, v. 6, n. 3, p. 347-350, 1967.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 8, p. 854-864, 2005.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de n e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 7-15, 1990.

SOUZA, E. L. L.; MACEDO, I. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar São Paulo: 2010, 314 p.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. cap. 9, p. 216-252.

SOUZA, S. R.; SANTOS, A. M.; FERNANDES, M. S.; GLASS, A. D. M. Nitrate transporters in higher plants: a general view. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, Seropédica, v. 26, n. 2, p. 78-86, 2006.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L M; FERNANDES, M. S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Artware Projetos Culturais, 2002. v. 1. 55 p.

SRIVASTAVA, H. S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. **Phytochemistry**, New York, v. 19, n. 5, p. 725-733, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, n. 10, p. 1005-1024, 2000.

UNNO, H.; UCHIDA, T.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; SUGIYAMA, T.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H.; HASE, T.; KUSUNOKI, M. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 39, p. 29287-29296, 2006.

VALE, D. W.; PRADO, R. M.; AVALHÃES, C. C.; HOJO, R. H. Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 2, p. 189-196, 2011.

VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. Induction of nitrate reductase host gene expression has a negative effect on the expression of transgenes driven by the nitrate reductase promoter. **Plant Science**, Limerick, v. 107, n. 1, p. 95-104, 1995.

VELASCO-GARCÍA, M. N.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. **Biosystems Engineering**, Londres, n. 1, v. 84, p.1-12, 2003. Disponível em: <[http://dx. doi:10.1016/S1537-5110\(02\)00236-2](http://dx.doi:10.1016/S1537-5110(02)00236-2)>.

VILLALOBOS, E.; CARVAJAL, J. F. La actividad de la reductasa del nitrato como guía de la fertilización nitrogenada de cinco especies agrícolas. **Revista Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 1, n. 1, p. 57-63, 1977.

VILLALOBOS, E.; CARVAJAL, J. F. Um método para analizar la actividad de la reductasa del nitrato em condiciones de campo. **Revista Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 2, n. 1, p. 69-81, 1978.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETTO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 239-269a.

VITTI, A. C.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 287-293, 2011.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; CANTARELLA, H.; FRANCO, H. C. J.; FARONI, C. E.; OTTO, R.; TRIVELIN, M. O.; TOVAJAR, J. G. Mineralização da palhada e crescimento de raízes de cana-de-açúcar relacionados com a adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n. esp., v. 32, p. 2757-2762, 2008b.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; PENATTI, C. P.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E.; FRANCO, H. C. J. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual da adubação e do sistema radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 249-256, 2007.

2 CAPÍTULO 2 – Adaptação do método de determinação da atividade da redutase do nitrato em tecido foliar de plantas de cana-de-açúcar

RESUMO - A redutase do nitrato (RN) é a primeira enzima na via de redução do nitrato pelas plantas, sendo considerada limitante para a produção dos vegetais. Sua atividade (aRN), geralmente alta em folhas, pode ser estimada pelo método *in vivo*, que se baseia na incubação de discos foliares em meio líquido, sob condições apropriadas, sendo a atividade indicada pela taxa de difusão de nitrito para o meio. Contudo, necessita-se adaptar o método em função da espécie vegetal de interesse. O objetivo deste capítulo foi padronizar, para cana-de-açúcar, as condições de determinação da atividade da enzima da redutase do nitrato. Além disso, caracterizar a atividade da RN nas folhas de plantas da cultura. Amostras foliares da cultivar IACSP93-3046 foram coletadas de uma lavoura de primeira soqueira, com idade de seis meses, em Jaboticabal-SP, sendo levadas rapidamente para análise em laboratório. A cada ensaio realizado modificou-se as condições de preparo das amostras foliares e do meio de incubação. Todas as coletas foram feitas seguindo o delineamento inteiramente casualizado com números variáveis de repetições para cada ensaio. O procedimento de análise mais adequado para estudar a atividade da enzima RN em cana-de-açúcar é coletar as folhas do tipo +1, durante o estágio de crescimento, às 13 h; cortar 25 discos foliares de 1 cm de diâmetro (500 mg) do ponto médio entre nervura e borda do terço médio da folha; adicionar os discos foliares em 10 mL de meio preparado com 2,5 mL de KNO_3 300 mmol dm^{-3} ; 2,5 mL de tampão KH_2PO_4 285 mmol dm^{-3} pH 7,3; 1,0 mL de Tween 20 a 0,6% (v/v) e 4,0 mL de água deionizada; submeter ao vácuo de 600 mm Hg, uma vez, por três minutos e incubar por 90 min, a 32 °C no escuro.

Palavras chave - *Saccharum* spp., atividade enzimática, estágio fenológico, método *in vivo*, nitrogênio, ritmo diurno

2.1 Introdução

A cana-de-açúcar é considerada a principal matéria prima para a produção de biocombustíveis renováveis no mundo (MILLER, 2010), portanto, é grande o interesse por conhecimentos relacionados à cultura. Muitos fenômenos ligados à aquisição de nutrientes como o nitrogênio pelas plantas de cana-de-açúcar ainda não estão bem esclarecidos, além de que, outras práticas como a adubação, irrigação e correção do solo para o cultivo ainda precisam ser melhores estudadas. Com isso, na pesquisa, variáveis influenciadas por estes fatores ou práticas devem ser mensuradas como ferramenta para interpretações mais adequadas de resultados experimentais na cultura.

A atividade enzimática nas plantas, especialmente a da redutase do nitrato (RN), pode servir como uma importante variável, uma vez que várias linhas de pesquisa mostram a alteração dos níveis de atividade da enzima em algumas espécies, com a modificação principalmente, de doses de nutrientes (BAR-ANKIVA; SAGIV; LESHEM, 1970; ABAYOMI; ETEJERE; FADAYOMI, 1988; SILVA, 1989; LAVON; GOLDSCHMIDT, 1999; LEMAÎTRE et al., 2008; AHMAD et al., 2010; BOBADE; KHYADE, 2012), condição hídrica e níveis de alumínio no solo (ABAYOMI; ETEJERE; FADAYOMI, 1988; SHARMA; DUBEY, 2005; CRUZ et al., 2011; CARLIN; RHEIN; SANTOS, 2012) e ainda com a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio (MACHADO et al., 1998; EL-KOMY; HAMDIA; EL-BAKI, 2003; DONATO et al., 2004).

Esta enzima é a primeira da via de incorporação do íon nitrato nas plantas superiores (BEEVERS; HAGEMAN, 1969). Sua redução constitui na etapa limitante e reguladora deste processo e, representa um papel fundamental na nutrição nitrogenada, e conseqüentemente, no crescimento e na produtividade dos vegetais (SOUZA; STARK; FERNANDES, 2002; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010, MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012).

O nível de atividade da enzima em tecidos de plantas é bastante influenciado pelas condições ambientais, tais como: temperatura, luminosidade e regime de precipitação pluviométrica (TAIZ; ZEIGER, 2006; LILLO, 2008; FRESCHI et al., 2009). Por isso, a importância de estudar estes parâmetros em conjunto com as

determinações enzimáticas. Tanto a síntese como o controle pós-traducional da enzima estão ligados não só aos estímulos ambientais, mas também aos intrínsecos da planta, como os níveis de certos metabólitos e idade fisiológica da planta (SILVA, 1989; SILVEIRA; CROCOMO, 1990; CAMPBELL, 1999; KAISER; WEINER; HUBER, 1999; SHARMA; DUBEI, 2005; LILLO, 2008). Portanto, faz-se pertinente o estudo de caracterização da atividade da redutase do nitrato (aRN) ao longo do dia, ciclo e em diferentes tipos de folha.

A aRN pode ser determinada pelo método *in vitro* ou *in vivo*. O método *in vitro* apresenta como desvantagem a necessidade de extração da enzima, por isso, mais laborioso. Enquanto que o *in vivo*, descrito por Jaworski (1971), pode ser usado mais facilmente sem a extração da enzima, porém apresenta como desvantagem a necessidade de adaptar-se as condições de realização do ensaio, conforme a natureza do tecido vegetal.

No processo de análise da aRN, o meio reacional, composto por solução tampão, KNO_3 , solvente e/ou detergente, precisa entrar em contato com o interior das células (JAWORSKI, 1971) e cada espécie de planta tem suas particularidades anatômicas e/ou fisiológicas, o que faz com que seja necessário o estabelecimento de condições apropriadas para cada espécie.

Estudos de otimização do método *in vivo* para diversas culturas ainda são comuns na literatura (SCHEURWATER et al., 2002; CHANDA, 2003; CAZETTA; VILLELA, 2004; AHMAD et al., 2010; BOBADE; KHYADE, 2012). Mesmo com a enorme importância da cultura da cana-de-açúcar, em consulta à literatura disponível, o relato mais completo encontrado, sobre otimização do método foi publicado em 1989, no Brasil, por Oliveira e Magalhães, contudo, existem relatos prévios em um estudo desenvolvido na Costa Rica (VILLALOBOS; CARVAJAL, 1978). O estudo foi desenvolvido com plantas de cultivares que hoje em dia não são mais utilizadas comercialmente no país. Entretanto, é possível que materiais genéticos mais modernos possam apresentar diferenças em relação aos antigos, principalmente quanto à aquisição de nutrientes e capacidade adaptativa ao estresse hídrico. Com isso, diferir quanto aos níveis de atividade enzimática.

Os ensaios de Oliveira e Magalhães (1989) foram realizados com plantas de três meses de idade cultivadas em condições controladas de casa-de-vegetação.

Com isso, plantas oriundas de condições de campo e em estágio fenológico mais avançado (180 dias após o corte) podem apresentar níveis de atividade diferenciados. Por conseguinte, existe a necessidade de maiores esclarecimentos destes aspectos a fim de direcionar o desenvolvimento de um protocolo confiável para a estimativa eficaz da atividade desta enzima tão promissora para pesquisas com cana-de-açúcar.

Tendo em vista o exposto, o objetivo do presente estudo foi padronizar, para cana-de-açúcar, as condições de determinação da atividade da enzima redutase do nitrato. Além disso, caracterizar a atividade da RN nas folhas de plantas da cultura.

2.2 Material e Métodos

Realizou-se a otimização das condições para a determinação da atividade da redutase do nitrato (aRN) para folhas da cana-de-açúcar. Foi utilizado o método *in vivo* estabelecido originalmente por Jaworski (1971), conforme descrito em Cazetta e Villela (2004) no estudo da padronização da análise para a gramínea *Brachiaria radicans*.

Naturalmente, as condições descritas e estabelecidas para folhas da gramínea *Brachiaria radicans*, poderiam não ser as mais adequadas para a cana-de-açúcar. Por isso, foram estudadas as variáveis descritas na sequência abaixo. A cada procedimento foi testado apenas um fator, mantendo-se constante os demais. O melhor resultado obtido a cada procedimento foi utilizado nos procedimentos seguintes. Ressalta-se, que num primeiro momento foi considerado como o melhor resultado, de cada ensaio, o tratamento que proporcionou maior média numérica da aRN.

Caracterização da área de coleta do material vegetal utilizado no estudo

As amostras de tecido foliar foram coletadas em março de 2011 de um canavial de primeira soqueira (IACSP93-3046), com aproximadamente seis meses de idade, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP em Jaboticabal - SP (FCAV/UNESP), cujas coordenadas geográficas são 21° 15' 22" de latitude sul e 48° 18' 58" de longitude oeste, com altitude de 575 m. Os dados

meteorológicos referentes ao período de estudo foram obtidos a partir dos registros fornecidos pela Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP e estão apresentados na Figura 1.

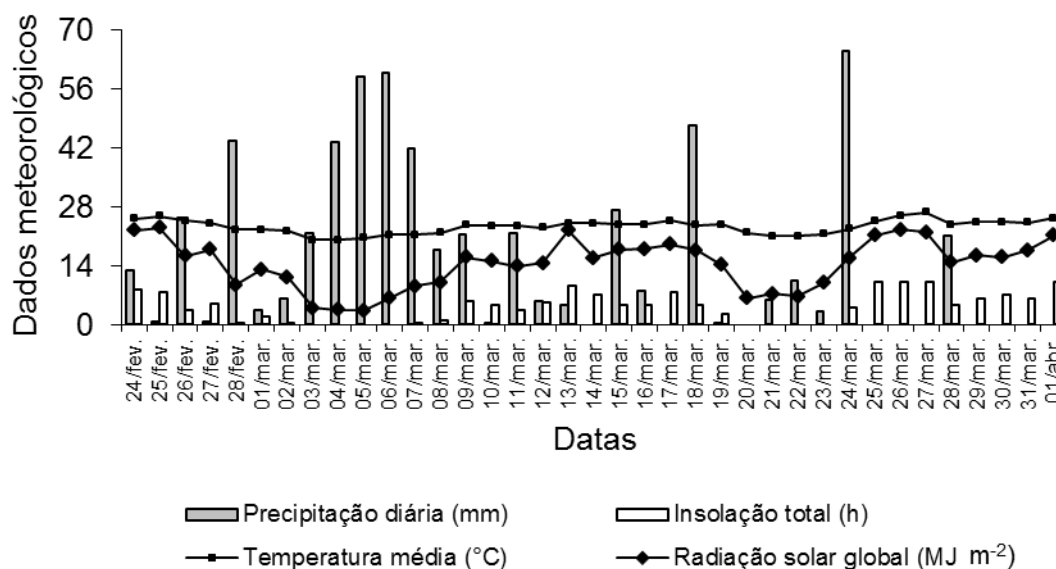


Figura 1. Dados meteorológicos diários obtidas pela Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, referentes ao período dos ensaios de padronização do método de determinação da aRN; (Jaboticabal- SP, 2011)

O canavial, originalmente, era utilizado como capineira para alimentação de bovinos, e recebeu adubação básica apenas quando foi implantado, em agosto de 2009. Portanto, em nenhum momento do estudo fez-se adubação de cobertura com N, aplicação de vinhaça ou agroquímicos, além dos cortes terem sido feitos sem o uso da queima.

A área apresenta um solo classificado como Latossolo Vermelho eutrófico (EMBRAPA, 2006). A amostragem para fins de avaliação da fertilidade do solo foi feita na profundidade de 0 a 20 cm, conforme Raij et al. (1997). A amostra coletada foi enviada ao laboratório de fertilidade do solo do Departamento de Solos e Adubos da FCAV/UNESP, onde foi analisada conforme metodologia descrita em Raij et al., (1987). A amostra apresentou as seguintes propriedades químicas: pH em CaCl₂ = 6,0; M.O.= 19,0 g dm⁻³; P (resina) = 10,0 mg dm⁻³; K = 2,1 mmol_c.dm⁻³; Ca = 37,0 mmol_c.dm⁻³; Mg = 22,0 mmol_c.dm⁻³; H+Al = 18,0 mmol_c.dm⁻³; SB= 61,1 mmol_c.dm⁻³;

CTC = 79,1 mmol_c.dm⁻³ e V = 77%. Os teores nutricionais observados nas folhas do tipo +1, aos 8 meses, no ano de 2012 foram: N = 19,6 g kg⁻¹; K = 12,3 g kg⁻¹; P = 2,1 g kg⁻¹; Ca = 3,1 g kg⁻¹; Mg = 1,7 g kg⁻¹; S = 1,9 g kg⁻¹; B = 15 mg kg⁻¹; Zn = 19 mg kg⁻¹; Fe = 83 mg kg⁻¹; Mn = 66 mg kg⁻¹; Cu = 5 mg kg⁻¹ e Mo = 0,07 mg kg⁻¹.

Curva padrão de nitrito

O método *in vivo*, descrito por Jaworski (1971) para a determinação da atividade da RN pode ser usado sem a extração da enzima, porém apresenta como desvantagem a necessidade de se adaptar as condições de realização do ensaio, conforme a natureza do tecido vegetal. O método tem como princípio que a quantidade de nitrito liberada por fragmentos de tecidos frescos num tampão, na presença do substrato nitrato e de substâncias promotoras de permeabilidade da membrana vegetal, reflete a atividade potencial da RN contida naquele tecido (JAWORSKI, 1971).

Para calcular a concentração de nitrito produzida pelas amostras foi necessário preparar uma curva padrão. Para isso, foi preparada uma solução com nitrito de sódio cristalizado (Reagen[®]), cuja concentração de NO₂⁻ foi de 3,29 µg mL⁻¹. Foram retiradas, em triplicatas, alíquotas de 0,5 mL para o preparo dos padrões (Figura 2), que tiveram concentrações variando de 1,79 a 17,85 µmol dm⁻³ de NO₂⁻. A alíquota foi acrescentada a 0,5 mL de solução composta por sulfanilamida (Vetec[®]) 10 g dm⁻³ em HCl 3 mol dm⁻³ (Merck[®]) e 0,5 mL de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,2 g dm⁻³ (Sigma[®]). A solução foi homogeneizada, e após 20 minutos diluída com água deionizada para 4 mL, a absorbância (540 nm) foi medida em espectrofotômetro, modelo Spectronic 20D. Com as respectivas concentrações de NO₂⁻ e com os valores de absorbância lidos, se definiu uma equação linear para calcular a aRN nos ensaios seguintes.

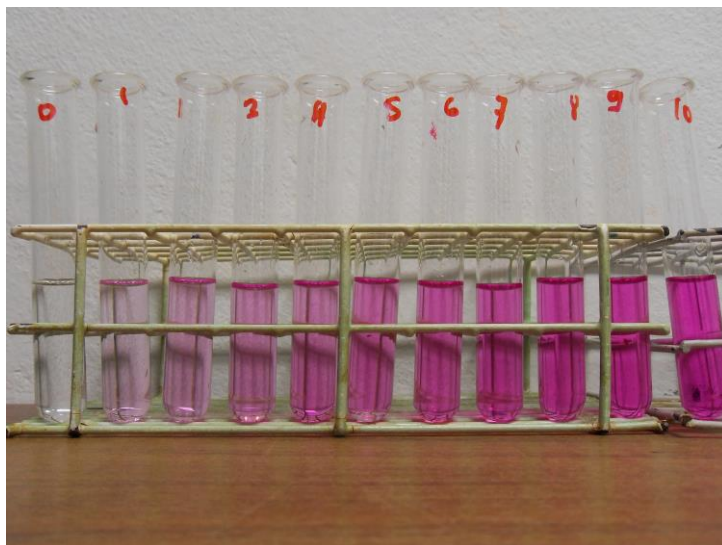


Figura 2. Padrões usados para a obtenção da curva padrão do nitrito

Massa do tecido vegetal fresco

Para obtenção de uma leitura colorimétrica dentro dos limites do espectrofotômetro, se faz necessário o estudo da quantidade de amostra a ser analisada. No ensaio para determinação da melhor massa de tecido foliar, cada unidade experimental foi proveniente de cinco folhas coletadas de pontos aleatórios, espaçados de aproximadamente dois metros dentro do canavial. As folhas coletadas foram do tipo +1 (Figura 3A), ou seja, primeira folha de cima para baixo que apresenta o “dewlap” visível conforme numeração do sistema de “Küijper” como citado por Gallo, Alvarez e Abramides (1962).

Os tratamentos foram constituídos de diferentes quantidades de tecido foliar: Coletou-se 10 discos foliares que pesavam 195 mg; 15 discos (297mg); 20 discos (394 mg), 25 discos (478 mg) e 30 discos (573), analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições.

As folhas foram coletadas às 10:00 horas, horário este, baseado no trabalho de Oliveira et al. (2005) com mudas de pupunheira. Sendo acondicionadas em uma caixa isolante térmica com gelo e levadas imediatamente para análise no laboratório de análises química e bioquímica de plantas do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP. Os discos com área de $0,7854 \text{ cm}^2$, cada, foram retirados com o auxílio de um furador de rolhas. Os furos foram realizados no terço médio da folha no sentido do comprimento (Figura 3B), sendo descartada a nervura central. Para

cortar os discos colocou-se cinco folhas sobrepostas (uma folha de cada ponto de coleta) sobre papel jornal a fim de facilitar o corte.

A análise laboratorial foi realizada nas mesmas condições citadas por Cazetta e Villela (2004), descrito no Apêndice deste trabalho, diferindo na quantidade de tecido vegetal, que ao invés de 300 mg, analisou-se quantidades que variaram de aproximadamente 200 a 600 mg como especificado na descrição dos tratamentos.

A aRN foi estimada em μmol de nitrito liberado de 1 g de tecido fresco por hora de incubação ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{NO}_2^-$) e foi calculada com base na equação linear obtida a partir do preparo prévio da curva padrão.

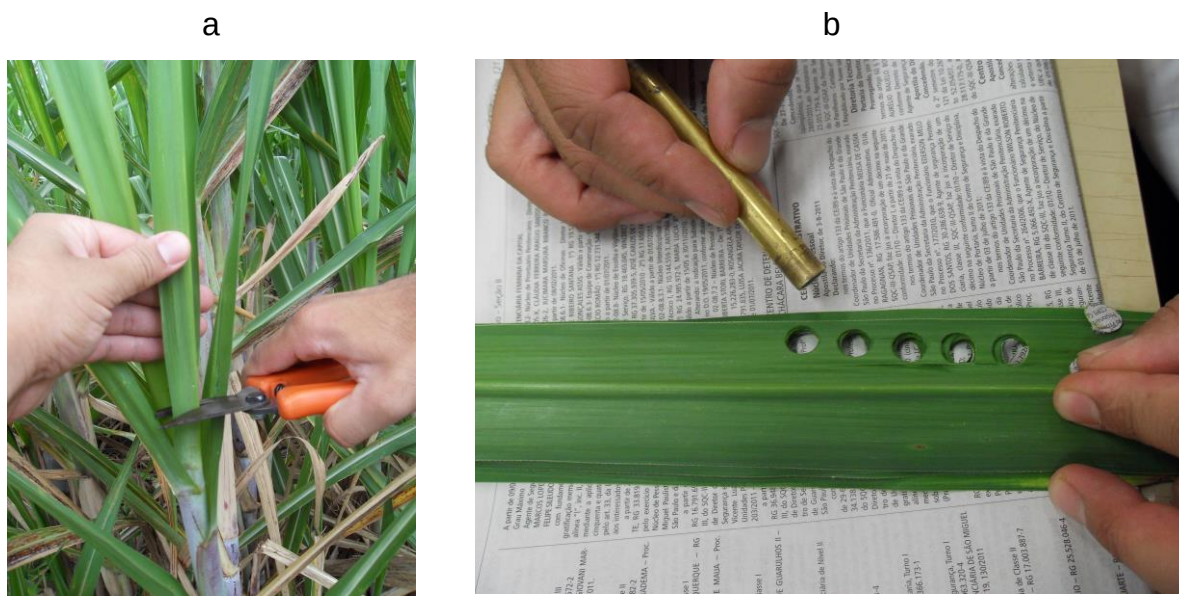


Figura 3. Detalhe do corte da folha do tipo +1(A) e furos realizados no terço médio da folha no sentido do comprimento para a coleta de tecido foliar (B)

Tempo de incubação

Para otimizar o tempo de imersão do tecido no meio de incubação, cada unidade experimental foi constituída por cinco folhas coletadas de pontos aleatórios, da mesma forma relatada no ensaio anterior. Os tratamentos foram constituídos por tempos de incubação: 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105 e 120 minutos, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio anterior, por sua vez, diferindo na quantidade de tecido vegetal, que ao invés de 300 mg, analisou-se 500

mg de tecido foliar (25 discos), pois apresentou melhor resultado (maior valor médio de aRN) em ensaio anterior. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 35 °C, e, a cada 15 minutos três repetições eram analisadas.

Tipo de solvente

Para se determinar o melhor solvente, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de diferentes tipos de solventes: acetato de etila, acetona, n-Butanol, etanol; n-Propanol e controle com água deionizada, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio anterior para se determinar o melhor tempo de incubação, porém por sua vez, o tempo foi fixado em 120 minutos (maior valor de aRN encontrado). Todas as amostras foram preparadas com os respectivos solventes na concentração de 1% (v/v).

Concentração do solvente (n-propanol)

Com finalidade de confirmar, e verificar qual a concentração do solvente que proporcionou maior aRN nas folhas, no caso o n-Propanol, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de concentrações de n-Propanol: 1; 2; 3; 4; 5; 6% (v/v) e controle com água deionizada, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio anterior para se determinar o melhor solvente.

Tipo de detergente

Quanto ao ensaio para determinar o melhor detergente, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de tipos de detergentes: Triton X-100, Tween 20; Tween 80 e controle com água deionizada, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para se determinar a melhor concentração do solvente, porém, os resultados anteriores mostraram que a adição dos solventes

testados prejudicou a análise da aRN, portanto, ao invés de adicionar solvente, adicionou-se o mesmo volume, porém, de água deionizada. Todas as amostras foram preparadas com os respectivos detergentes na concentração de 0,1% (v/v).

Concentração do detergente (Tween 20)

No ensaio para determinar a concentração do detergente que proporcionou maior aRN nas folhas, no caso o Tween 20, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de concentrações de Tween 20: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 1% (v/v) e controle com água deionizada, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para se determinar o melhor detergente.

Concentração de KNO₃

No ensaio para determinar a concentração ótima de KNO₃, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de concentrações de KNO₃: 30; 60; 90; 180; 270; 360; 450; 540 e 630 mmol dm⁻³ e controle com água deionizada, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para se determinar a melhor concentração do tensoativo Tween 20, no caso, 0,4% (v/v).

Valor de pH do tampão fosfato

Para determinação do pH do tampão fosfato (preparado com KH₂PO₄) na concentração de 200 mmol dm⁻³, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de tampão fosfato (200 mmol dm⁻³) preparado com diferentes valores de pH: 5,4; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0; 7,4; 7,8; e 8,2, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para se determinar a melhor concentração do KNO₃, que mostrou que o maior valor médio de aRN foi obtido na concentração de 90 mmol dm⁻³ de KNO₃,

portanto, foi a concentração usada neste, e nos ensaios posteriores para a etapa da otimização.

Concentração do tampão fosfato

Para determinar qual a melhor concentração do tampão fosfato (KH_2PO_4), cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de concentrações do tampão fosfato: 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500 mmol dm^{-3} e controle com água deionizada, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para se determinar o melhor pH do tampão fosfato, que mostrou que a aRN foi mais alta no pH 7,0, portanto, esse foi o pH do tampão usado no ensaio.

Eficiência da submissão das amostras ao vácuo

Verificando a eficiência do uso de vácuo nas amostras, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de combinações de número de vezes e tempo de submissão das amostras ao vácuo de 600 mm Hg (Figura 4), e foram os seguintes: SV = sem vácuo; V11 = 1 vez + 1 min; V21 = 2 vezes + 1 min; V31 = 3 vezes + 1 min; V41 = 4 vezes + 1 min; V12 = 1 vez + 2 min e V13 = 1 vez + 3 min, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para se determinar a melhor concentração do tampão fosfato, que mostrou que a aRN foi mais alta na concentração de 300 mmol dm^{-3} , portanto, essa foi a concentração do tampão usado no ensaio.



Figura 4. Frascos contendo discos foliares e meio de incubação, em dessecador para submissão a vácuo

Temperatura da incubação

Para determinar a melhor temperatura de incubação das amostras, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de diferentes valores de temperatura de incubação: 20; 25; 30; 35; 40 e 45 °C, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para verificar a eficiência da incubação (com ou sem vácuo), que mostrou que a aRN foi mais alta quando se submeteu as amostras ao vácuo por três minutos ininterruptos, portanto, essa foi a condição adotada no ensaio.

Para obtenção das temperaturas testadas, cada quatro frascos escuros contendo um tratamento foram colocados em determinado micro-clima descritos a seguir. O tratamento de 20 °C foi colocado em sala fechada com ar condicionado a 20 °C; o tratamento de 25 °C foi mantido em um equipamento de banho-maria desligado; o tratamento de 35 °C foi mantido em banho-maria com a temperatura definida. Para os tratamentos com 30, 40 e 45 °C foi necessário controlar a temperatura durante todo o período de realização do ensaio, com a retirada e/ou adição de água quente e fria nos recipientes inseridos em caixas de isopor, todos os tratamentos foram monitorados com termômetros.

Tipo de folha a ser coletada

No ensaio para se determinar a melhor folha a ser coletada na planta, cada unidade experimental foi constituída por cinco folhas, obtidas da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos dos tipos: folha 0; folha +1; folha +2; folha +3; folha +4; folha +5 e folha +6, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Segundo classificação do sistema de “Küijper” (GALLO; ALVAREZ; ABRAMIDES, 1962), a folha +1 é a que apresenta o último “dewlap” superior visível, sendo a folha 0 a imediatamente superior a esta, já a folha do tipo +2 é a subjacente a +1 e assim por diante, até a folha +6, que está localizada na parte inferior da planta. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para determinar a temperatura de incubação, que mostrou que a aRN foi mais alta a 35 °C, portanto, a temperatura de incubação foi mantida conforme ensaios anteriores.

Posição de coleta de tecido na folha

No ensaio para determinar a posição de coleta de tecido na folha, (base, meio e ponta), cada unidade experimental foi obtida da forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de tecidos, livre das nervuras centrais, provenientes de diferentes porções ao longo da mesma folha: base; meio e ponta, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com sete repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições citadas no ensaio para se determinar o tipo de folha que apresenta maior aRN, no caso, a folha do tipo 0 (zero), portanto, o tipo de folha analisado neste ensaio.

Horário de coleta

Para determinar o melhor horário de coleta dos tecidos foliares da cana-de-açúcar, cada unidade experimental foi constituída por cinco folhas coletadas de pontos aleatórios por três dias. Os tratamentos foram constituídos de horários de coleta com intervalos de 1 hora durante o dia, portanto, 13 tratamentos iniciando às 6:00 e finalizando às 18:00 horas, analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições. Cada repetição foi constituída por média de quatro avaliações por dia.

A título de monitoramento das condições climáticas, os dados meteorológicos horários foram obtidos a partir dos registros fornecidos pela Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP e estão apresentados a seguir (Figura 5). A análise da aRN foi realizada nas folhas 0 e +1, porém, nas condições citadas no ensaio para determinar a posição de coleta de tecido na folha, mantendo-se a coleta de tecidos na região mediana da folha, conforme ensaios anteriores.

A partir deste ponto, o método foi considerado otimizado para plantas de cana-de-açúcar, portanto, os ensaios seguintes foram realizados com base não mais nos valores de médias, mas sim, nos pontos de máxima, calculados por derivação. O método definitivo está descrito no tópico Conclusão neste capítulo.

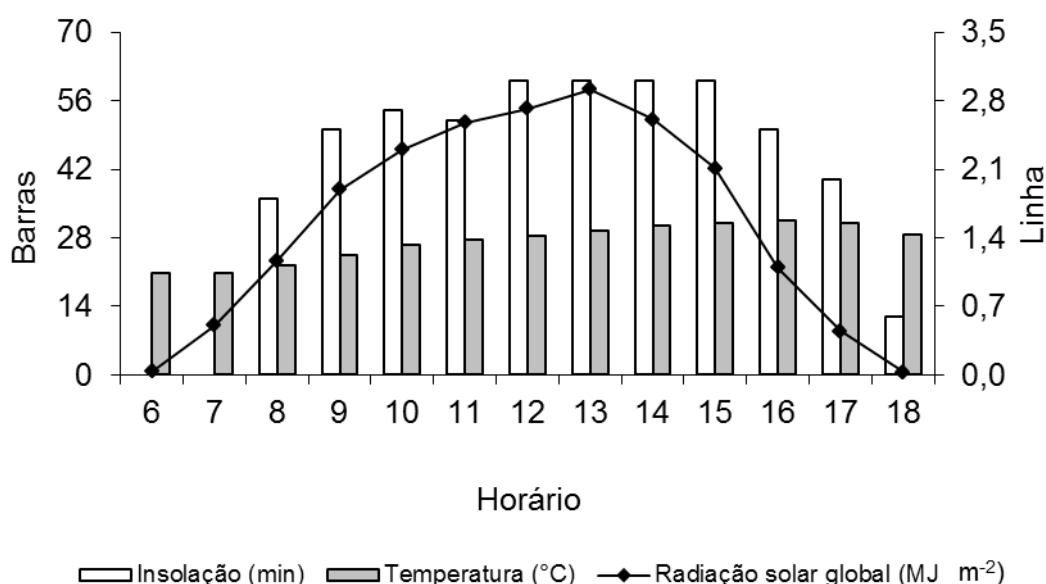


Figura 5. Dados meteorológicos obtidos pela Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, referentes ao ensaio em diferentes horários de coleta. Cada ponto ou barra corresponde à média dos dias 26; 27 e 29 de março de 2011; (Jaboticabal – SP, 2011)

Uso de vácuo e/ou solvente

Com finalidade de se entender melhor a relação entre a condição de vácuo e utilização ou não de solvente foi realizado um ensaio com tecidos foliares provenientes de pontos aleatórios da mesma área cultivada com cana-de-açúcar, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os

tratamentos consistiram de combinações entre vácuo de 600 mm Hg e solvente e foram os seguintes: 1 = H₂O deionizada + vácuo 3 min; 2 = H₂O deionizada + sem vácuo; 3 = n-propanol 1% (v/v) + vácuo 3 min; 4 = n-propanol 1% (v/v) + sem vácuo; 5 = H₂O deionizada + vácuo 3 vezes + 1 min; 6 = n-propanol 1% (v/v) + vácuo 3 vezes + 1 min. Analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições otimizadas com os ensaios anteriores.

Avaliação da aRN ao longo do ciclo da cana-de-açúcar

Com finalidade de se acompanhar a evolução do crescimento e desenvolvimento da soqueira de cana-de-açúcar, aliados ao nível de atividade da redutase do nitrato (RN) em função do tempo após o corte. Foi realizado um ensaio com tecidos foliares provenientes de pontos aleatórios da mesma área utilizada para a padronização do método, descrito anteriormente, porém no ano posterior (2012).

As verificações foram feitas mensalmente (todo dia 10), tendo início em janeiro e finalizando em novembro de 2012. A cada verificação avaliou-se visualmente o estágio fenológico, conforme classificação descrita em Jadoski et al. (2010); altura de 10 plantas tomadas ao acaso, da superfície do solo até a inserção da folha +1; e, a aRN nas folhas do tipo 0 e +1 conforme método padronizado descrito no tópico Conclusão neste capítulo. Foram coletadas cinco folhas de cada tipo testado, uma de cada planta ao acaso, sendo analisadas com 4 repetições.

As variáveis climáticas, temperatura média, insolação, radiação solar global e precipitação pluviométrica foram monitoradas utilizando-se dos dados coletados na Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP (Figura 6).

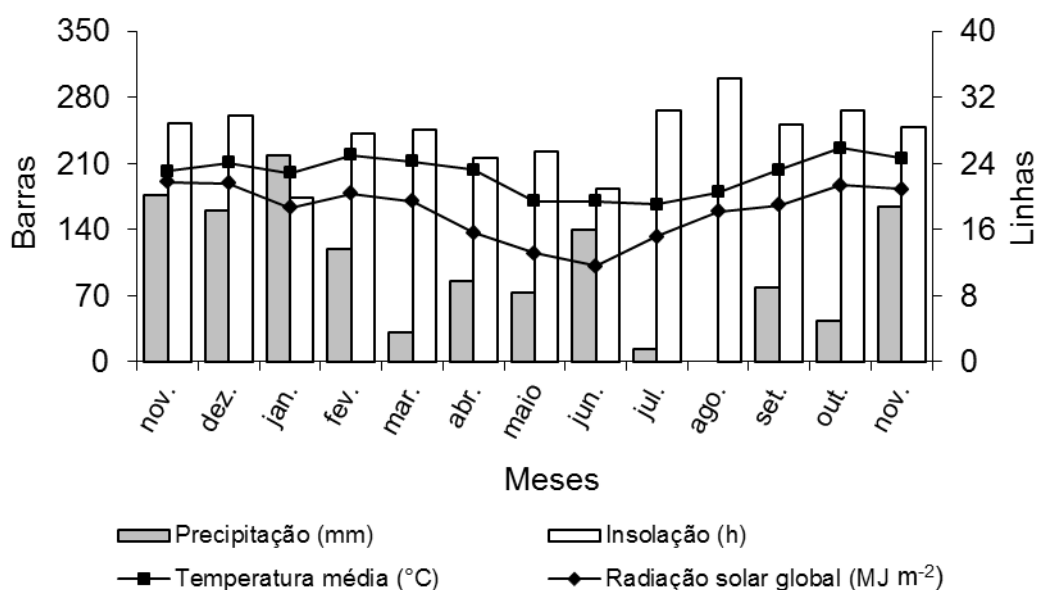


Figura 6. Dados meteorológicos obtidos pela Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, referentes ao ensaio de coleta ao longo do ciclo da cana-de-açúcar. Cada ponto ou barra corresponde à média mensal do ano de 2012; (Jaboticabal – SP, 2012)

Procedimento de lavagem das folhas

Para verificar a influência da lavagem dos tecidos na análise, foi realizado um ensaio com tecidos foliares provenientes de pontos aleatórios da mesma área cultivada com cana-de-açúcar, cada unidade experimental foi obtida da mesma forma relatada anteriormente. Os tratamentos foram constituídos de diferentes procedimentos de preparo das folhas: 1 = folhas sem lavagem; 2 = folhas com lavagem + H₂O deionizada + secagem com papel toalha; 3 = folhas com lavagem + H₂O deionizada + úmidas; 4 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + H₂O deionizada + secagem com papel toalha; 5 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + H₂O deionizada + úmidas; 6 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + HCl (0,3% v/v) + H₂O deionizada + secagem com papel toalha; 7 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + HCl (0,3% v/v) + H₂O deionizada + úmidas. Analisados em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. A análise da aRN foi realizada conforme condições otimizadas com os ensaios anteriores.

Análises estatísticas dos dados

Os dados obtidos em cada ensaio foram submetidos à análise para a verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Sisvar, ao passo que a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Cochran ($p > 0,05$) no programa estatístico Saeg. Os dados em que não foram verificadas normalidade e homogeneidade foram submetidos às devidas transformações. Em seguida procedeu-se à análise de variância pelo teste F. Quando significativo, as médias qualitativas foram comparadas usando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, e, no caso de variáveis quantitativas, através de análise de regressão, usando o programa estatístico Sisvar.

2.3 Resultados e Discussão

O procedimento para a otimização da análise da aRN nos tecidos foliares consistiu de vários ensaios consecutivos, com modificação de apenas um fator a cada ensaio, tomando sempre, para os próximos ensaios, o maior valor de aRN observado no resultado do ensaio anterior (conforme sequência apresentada na Tabela 1). Contudo, a conclusão foi baseada nos pontos de máxima aRN obtidos por cálculo de derivação ou comparação estatística das médias. Os resultados obtidos comprovaram a necessidade de realização de uma padronização prévia do método *in vivo* para plantas de cana-de-açúcar. Na Tabela 1 estão apresentados os resumos das análises de variância dos dados numéricos gerados em cada ensaio.

Tabela 1 Resumo das análises de variância dos ensaios realizados para a padronização do método para determinação da aRN

Ensaio	GL Tratamentos	GL Resíduos	F calculado	CV (%)
Curva padrão do nitrito	10	22	8257***	1,22
Tecido foliar	4	15	14,487***	8,17
Tecido (Absorbância)	4	15	49,945***	7,24
Tempo de incubação	7	16	8,371***	9,08
Tempo (Absorbância)	7	16	132,583***	8,48
Tipo de solvente	5	18	1,645 ^{ns}	11,83
Concentração de n-propanol	6	14	28,609***	6,27
Tipo de detergente	3	16	0,393 ^{ns}	10,85
Concentração de Tween 20	7	16	2,58 ^{ns}	5,92
Concentração de KNO ₃	9	20	74,027***	7,91
pH do tampão	7	16	14,235***	6,21
Concentração do tampão	10	22	2,89*	11,79
Submissão ao vácuo	5	14	1,986 ^{ns}	5,83
Temperatura da incubação	5	18	105,546***	10,44
Tipo de folha	6	14	14,366***	6,67
Parte da folha	2	18	8,684**	10,47
Horário de coleta (Folha 0)	12	26	11,478***	10,21
Horário de coleta (Folha +1)	12	26	9,748***	11,43
Vácuo e/ou solvente	5	18	3,066*	7,76
Ciclo da cana (Folha 0)	10	33	276,816***	5,57
Ciclo da cana (Folha +1)	10	33	169,310***	6,59
Ciclo da cana (Altura)	10	33	597,107***	6,68
Lavagem das folhas	6	21	2,642*	7,40

GL = grau de liberdade; CV (%) = coeficiente de variação; ^{ns} = não significativo; ***, **, * = significativo aos níveis de 0,1; 1 e 5 % de probabilidade, respectivamente

Curva padrão de nitrito

No ensaio para determinação da curva padrão de nitrito, observou-se aumento linear nos valores de absorbância a 540 nm à medida que aumentou a concentração de nitrito nas soluções testadas (Figura 7). O coeficiente de correlação observado foi máximo ($R^2 = 1$), o que significa que os dados obtidos foram

representados perfeitamente pelo modelo linear. Assim, é alta a confiabilidade no uso da equação gerada, para estimar a aRN nas amostras foliares.

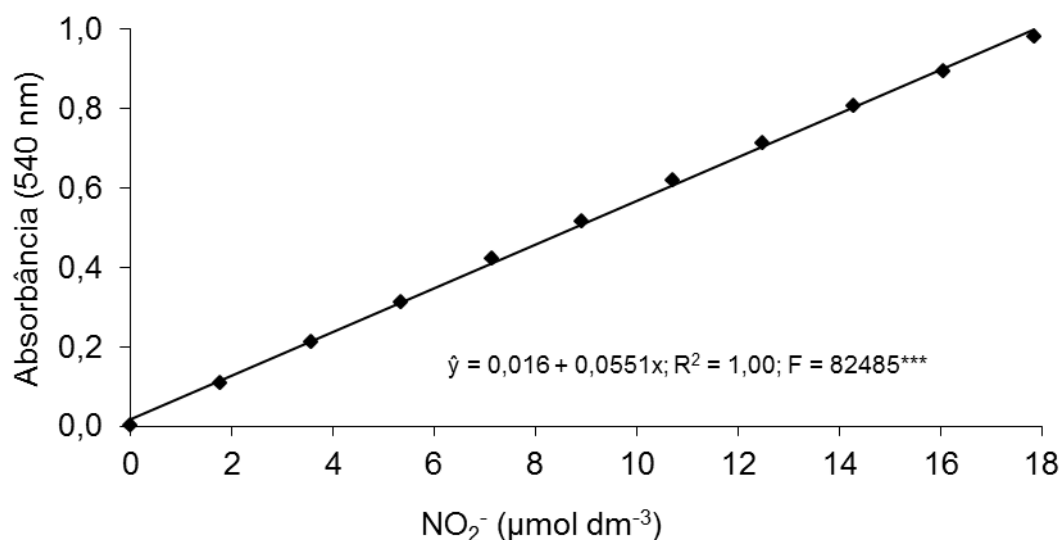


Figura 7. Curva padrão do nitrito. Valores de absorbância obtidos após 20 min de reação de 0,5 mL de NaNO₂, em crescentes concentrações, com 0,5 mL de solução composta por sulfanilamida 10 g dm⁻³ em HCl 3 mol dm⁻³ e 0,5 mL de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,2 g dm⁻³ diluídos em água deionizada até o volume de 4 mL. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Massa do tecido vegetal fresco

As leituras colorimétricas determinadas em espectrofotômetro aumentaram em função do aumento do tamanho da amostra de discos foliares. O contrário disso foi observado após a estimativa da aRN (Figura 8).

Escolheu-se a quantidade de 500 mg de tecido foliar, o que corresponde a 25 discos foliares com 1 cm de diâmetro cada. O corte das folhas em discos foliares eliminou a necessidade do uso de balança analítica, o que possibilitou a agilidade da análise, pois, segundo Villalobos e Carvajal (1978) que já haviam estudado este aspecto, não existe diferença estatística entre se proceder a pesagem ou a medida da área foliar (número de discos). A escolha de 500 mg foi baseada na melhor leitura colorimétrica, respeitando-se os limites de confiabilidade do espectrofotômetro (leituras de 0,2 a 0,8).

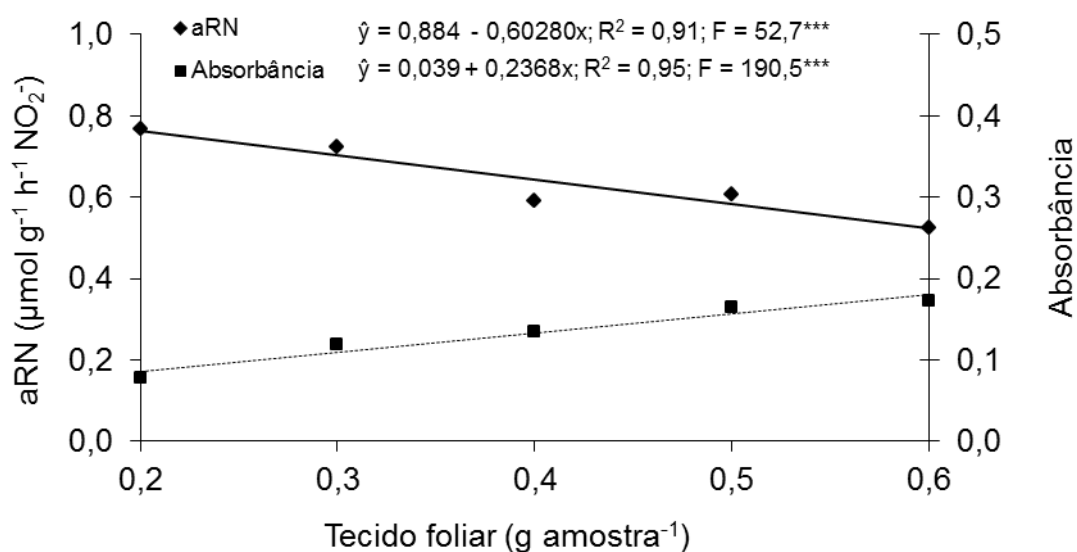


Figura 8. Atividade da RN e absorbância em função da quantidade de tecido vegetal. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h, incubados por 60 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mmol dm⁻³ pH 7,4; 2,5 mL de KNO₃ 60 mmol dm⁻³; 2,5 mL de n-butanol 1% (v/v); 1,0 mL de Triton X-100 0,1% (v/v) e 1,5 mL de H₂O deionizada. Amostras submetidas três vezes ao vácuo por 1 min. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Tempo de incubação

O prolongamento do tempo de incubação das amostras também causou o aumento dos valores de absorbância (Figura 9). A aRN decresceu até um ponto mínimo aos 75 min, mas foi somente a partir dos 90 min que as leituras colorimétricas se adequaram a faixa confiável do aparelho. Vilallobos e Carvajal (1978) ensaiaram suas amostras por apenas 30 min, porém, recompensaram utilizando 1 g de matéria vegetal, o que possibilitou a verificação de leituras colorimétricas adequadas. Por outro lado, Oliveira e Magalhães (1989), utilizando 500 mg de material vegetal, estabeleceram como apropriado um tempo de 60 min. No presente trabalho, optou-se por incubar as amostras por 90 min em função da não observação de leituras colorimétricas acima de 0,2, entretanto, também seria adequado incubar por 60 minutos, caso fosse aumentado o número de discos foliares.

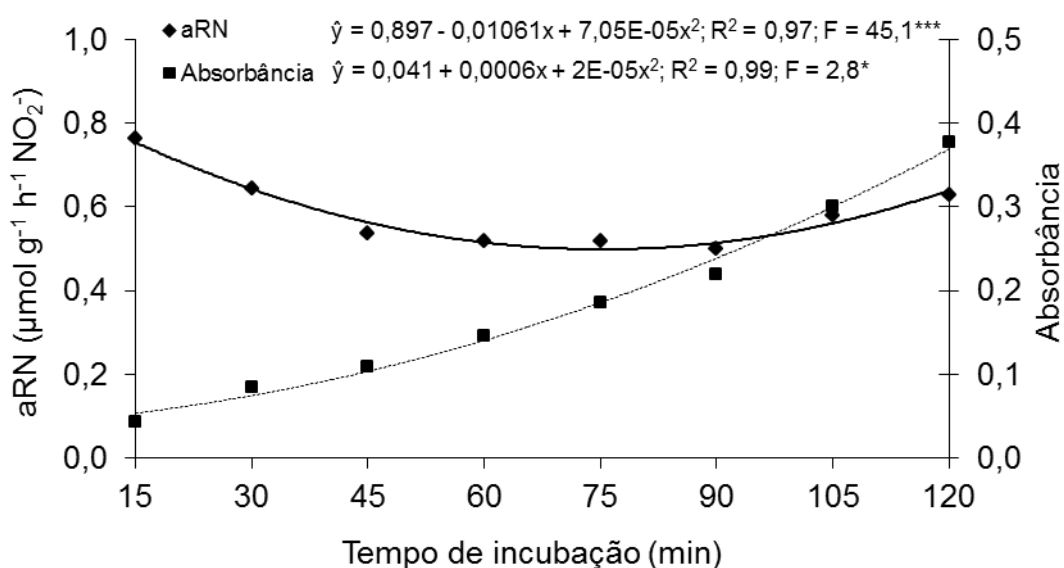


Figura 9. Atividade da RN e absorbância em função do tempo de incubação das amostras. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mmol dm⁻³ pH 7,4; 2,5 mL de KNO₃ 60 mmol dm⁻³; 2,5 mL de n-butanol 1% (v/v); 1,0 mL de Triton X-100 0,1% (v/v) e 1,5 mL de H₂O deionizada. Amostras submetidas três vezes ao vácuo por 1 min. Cada ponto corresponde a média de três repetições. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade; * - significativo a 5% de probabilidade

Tipos e concentrações de solventes e detergentes

Não se constatou diferença significativa entre os solventes testados (Figura 10). Embora os solventes testados não tenham diferido estatisticamente, optou-se por montar um ensaio para testar diferentes concentrações de um dos solventes (Figura 11), onde o solvente escolhido foi o n-Propanol, pois é o mais utilizado neste tipo de análise e inclusive foi este o solvente empregado no estudo de Oliveira e Magalhães (1989). O resultado sugeriu que, a aplicação do solvente interferiu de forma negativa na análise, pois a medida que aumentou-se a concentração de n-Propanol no meio de incubação, a aRN diminuiu (Figura 11).

De modo geral, ao proceder a análise, é necessária a imersão completa dos tecidos foliares no meio reacional conforme preconizado por Jaworski (1971), e devido a presença de gases nos espaços intercelulares o tecido tende a flutuar. Cortar o limbo foliar no formato de discos, ao invés de segmentos e submeter as amostras a vácuo, são estratégias para facilitar a submersão. Além disso, a tensão

superficial do meio líquido e a barreira imposta pela membrana celular reduzem o contato da solução com o interior do citoplasma. Então foi esperado que, com a incubação dos tecidos de cana-de-açúcar em meio contendo algum tipo de solvente ou detergente, a aRN seria mais elevada que o controle porém isso não aconteceu. Contrariando as expectativas, houve menor redução de nitrato nos tecidos analisados com meio contendo solvente (Figura 11). Uma explicação para isso poderia ser o fato de que alguns solventes orgânicos podem desorganizar a configuração de proteínas (JAMUR; OLIVER, 2010). Com isso, não se utilizou solvente nos ensaios posteriores.

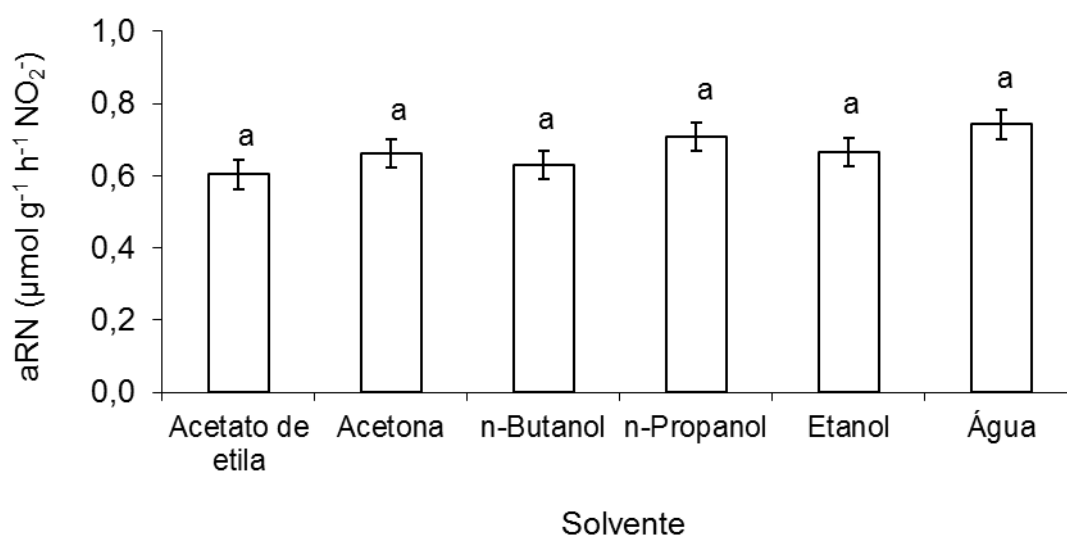


Figura 10. Atividade da RN em função do tipo de solvente no meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mmol dm⁻³ pH 7,4; 2,5 mL de KNO₃ 60 mmol dm⁻³; 2,5 mL de diferentes tipos de solvente a 1% (v/v); 1,0 mL de Triton X-100 0,1% (v/v) e 1,5 mL de H₂O deionizada, submetida três vezes ao vácuo por 1 min. Cada barra corresponde a média de quatro repetições. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

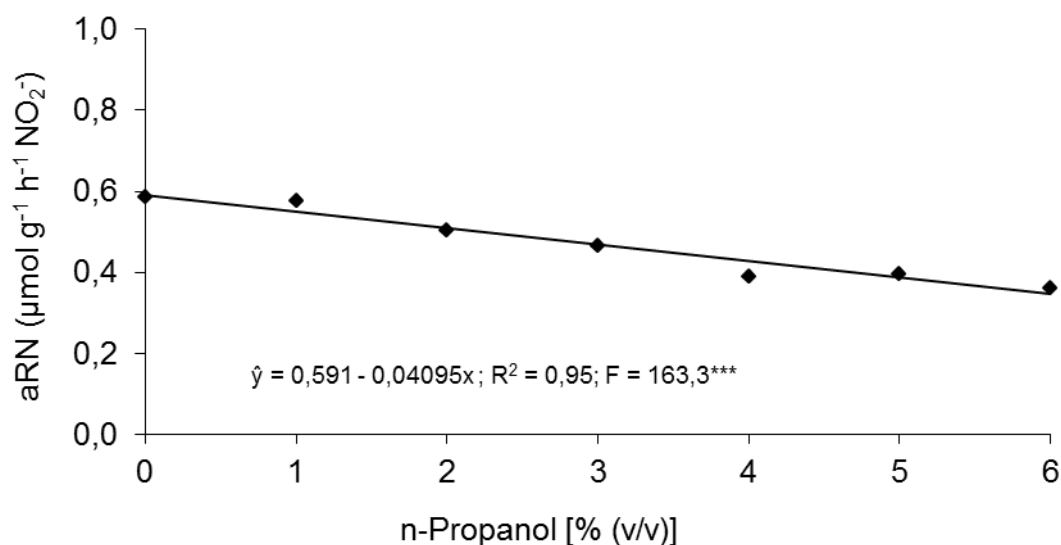


Figura 11. Atividade da RN em função da concentração do solvente n-Propanol adicionado ao meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mmol dm⁻³ pH 7,4; 2,5 mL de KNO₃ 60 mmol dm⁻³; 2,5 mL de n-propanol; 1,0 mL de Triton X-100 0,1% (v/v) e 1,5 mL de H₂O deionizada, submetida três vezes ao vácuo por 1 min. Cada ponto corresponde a média de três repetições. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Não foi observada diferença estatística entre os tipos de detergentes ensaiados (Figura 12). A função de detergentes, assim como solventes orgânicos é promover a permeabilidade das membranas celulares (JAMUR; OLIVER, 2010), além disso, diminuir a tensão superficial do líquido (CAZETTA; VILLELA, 2004). Contudo, os resultados dos ensaios mostraram que a utilização dessas substâncias não se faz necessária para análise de tecidos foliares de cana-de-açúcar (Figuras 10 e 12).

No método original (JAWORSKI, 1971) e na maioria dos trabalhos de adaptação do método, para diversas espécies botânicas, que variaram concentrações e tipos de solventes (SCHEURWATER et al., 2002; CHANDA, 2003; CAZETTA; VILLELA, 2004), notou-se, de forma geral, certa dependência da aplicação de solventes no meio de incubação. Em contrapartida, outros autores não relatam o uso de solventes em suas análises (AHMAD et al., 2010; BOBADE; KHYADE, 2012).

Apesar de não se fazer necessária a utilização de detergente no meio de incubação, optou-se, pelo uso do detergente Tween 20, pois adicionalmente ao efeito permeabilizador de membrana, o detergente diminui a tensão superficial do meio de incubação (CAZETTA; VILLELA, 2004). A concentração de Tween 20 que proporcionou a maior aRN foi a de 0,6% (v/v) (Figura 13).

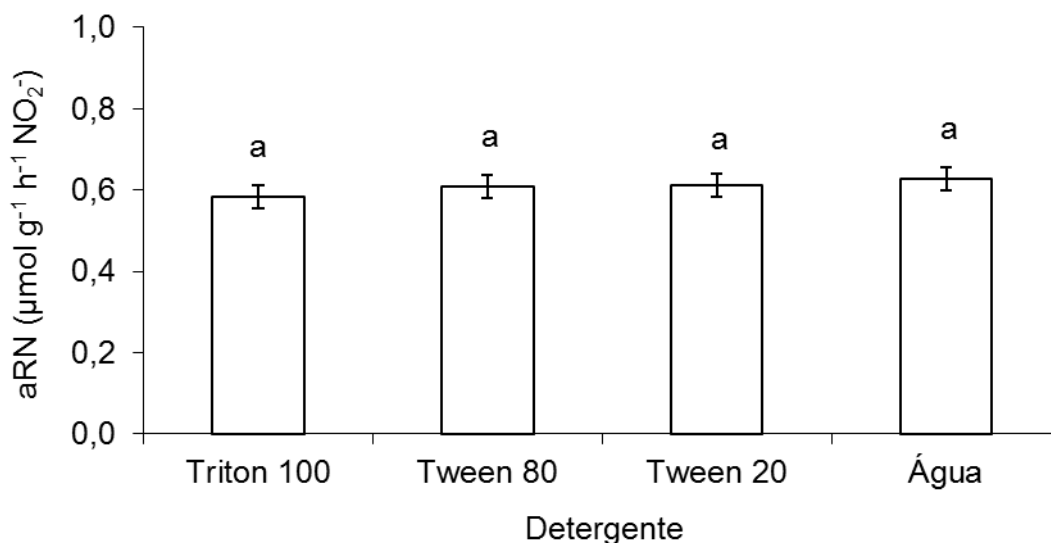


Figura 12. Atividade da RN em função do tipo de detergente adicionado ao meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mmol dm⁻³ pH 7,4; 2,5 mL de KNO₃ 60 mmol dm⁻³; 1,0 mL de detergente a 0,1% (v/v) e 4 mL de H₂O deionizada, submetida três vezes ao vácuo por 1 min. Cada barra corresponde a média de cinco repetições. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

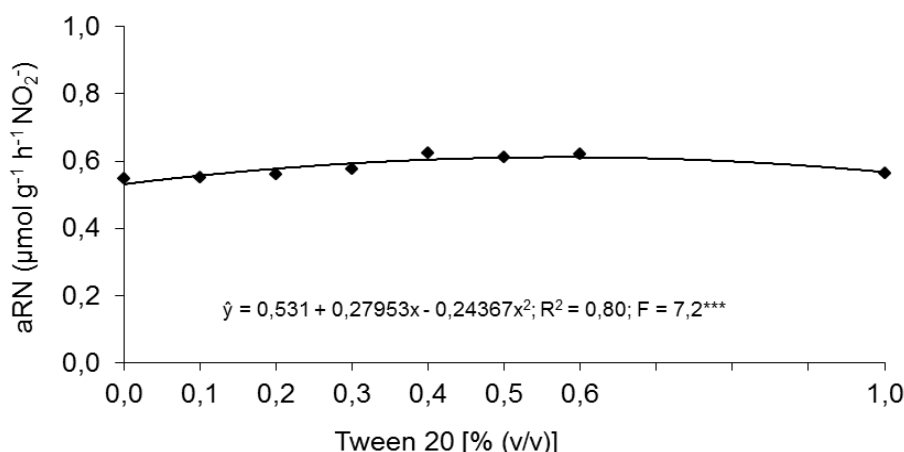


Figura 13. Atividade da RN em função da concentração do detergente Tween 20 adicionado ao meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mmol dm⁻³ pH 7,4; 2,5 mL de KNO₃ 60 mmol dm⁻³; 1,0 mL de Tween 20 e 4 mL de H₂O deionizada, submetida três vezes ao vácuo por 1 min. Cada ponto corresponde a média de três repetições. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Concentração de KNO₃

O resultado do ensaio com diferentes concentrações de nitrato de potássio confirmou a dependência do acréscimo de solução de nitrato no meio de incubação, pois praticamente não se observou aRN no tratamento ausente de KNO₃ (Figura 14). Os dados de aRN obtidos em função da concentração de KNO₃ se ajustaram melhor a uma curva do tipo cinética, conforme a clássica equação de Michaelis Menten (NELSON; COX, 2004) e, aumentaram até a concentração de 180 mmol dm⁻³, depois deste ponto, as estimativas permaneceram estáveis até 540 mmol dm⁻³. O último ponto da curva (630 mmol dm⁻³) não se mostrou ser um dado que se enquadre no modelo cinético, porém, tratava-se de uma concentração muito alta que caracterizou o prejuízo da aRN por razões biológicas, e foi mantido no conjunto de dados.

A adição de nitrato no meio de incubação é essencial para a verificação da atividade potencial da RN. Contudo, concentrações baixas ou muito altas podem interferir na estimativa. Os resultados mostraram que não houve qualquer aRN nos tecidos analisados sem KNO₃, o que sugere a carência de nitrato no citossol e/ou no vacúolo. Oliveira e Magalhães (1989) também observaram isto. Ishikawa et al.

(2009) e Silveira e Crocomo (1990) constataram que o nitrato se acumula muito pouco em plantas de cana-de-açúcar, até mesmo quando aplicadas altas doses de N, o que sugere que é prontamente metabolizado ao chegar nas folhas.

Em condições de campo, é possível que existam plantas de cana-de-açúcar que apresentem maior teor de RN que as plantas ensaiadas. Assim, a estimativa da aRN poderia ser sub-estimada ao aplicar menor quantidade de nitrato no meio, por isso é indicado o uso de KNO_3 em altas concentrações. A concentração otimizada no estudo foi de 300 mmol dm^{-3} de KNO_3 , pois foi a concentração intermediária do patamar observado com a saturação da enzima (Figura 14). Oliveira e Magalhães (1989) verificaram que nesta concentração não houve a diminuição da aRN por aumento da concentração salina porém, sugeriram que uma alta força iônica poderia ser desenvolvida no citossol, onde está localizada a RN, o que pode causar uma desestabilização no complexo de subunidades que compõem a molécula da RN, contudo, isto não foi observado no presente estudo, pois somente a partir da concentração de 540 mmol dm^{-3} que se observou a ausência de comportamento cinético da aRN (Figura 14), o que pode ser atribuído a razões biológicas.

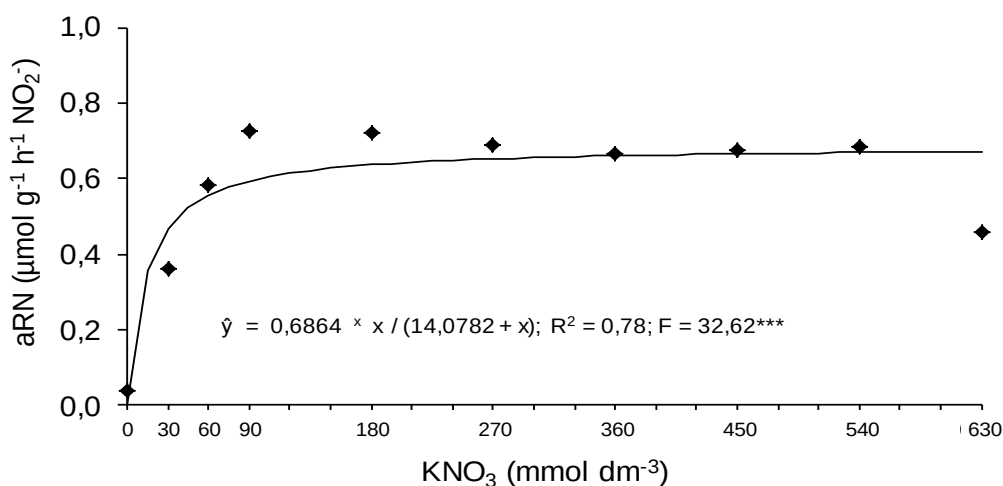


Figura 14. Atividade da RN em função do teor de nitrato no meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mmol dm^{-3} pH 7,4; 2,5 mL de KNO_3 ; 1,0 mL de Tween 20 0,4% (v/v) e 4 mL de H_2O deionizada, submetida três vezes ao vácuo por 1 min. Cada ponto corresponde a média de três repetições *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Valor de pH, concentração do tampão fosfato e temperatura da incubação

A aRN, em função do pH da solução tampão fosfato, atingiu um ponto máximo com o valor de 7,25 (Figura 15), mas na prática, se manteve estável na faixa de 6,6 a 7,8. A concentração do tampão (pH 7,25) que proporcionou maior aRN foi 285 mmol dm^{-3} (Figura 16), concentração esta, bem acima da utilizada por Oliveira e Magalhães (1989), (50 mmol dm^{-3}), que na ocasião não fizeram um estudo de otimização para essa variável.

A temperatura na qual as amostras foram incubadas implicou em efeito sobre a estimativa da aRN e atingiu ponto de máxima aRN a 32°C (Figura 17).

Os resultados observados nos ensaios de pH do tampão fosfato e temperatura do meio de incubação foram semelhantes aos obtidos por Oliveira e Magalhães (1989), que também estudaram plantas de cana-de-açúcar.

Na ocasião, atribuíram os menores valores de atividade observados, com as menores e maiores temperaturas às alterações na permeabilidade das membranas, o que diminuiu a absorção e o transporte de nitrato para os sítios de redução no interior das células, além das alterações conformacionais da molécula da enzima, o que a torna inativa. O efeito do pH também estaria relacionado com permeabilidade de membrana.

A combinação nas proporções adequadas do pH e temperatura é importante, pois influencia na reorganização das moléculas constituintes das enzimas expondo mais sítios ativos para a catálise enzimática (BOBADE; KHYADE, 2012).

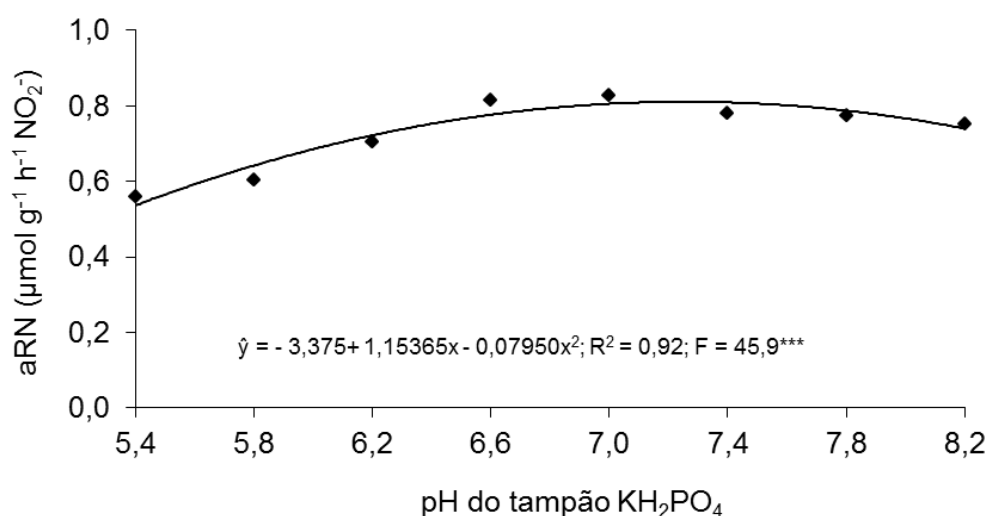


Figura 15. Atividade da RN em função do pH do meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 200 mol dm⁻³; 2,5 mL de KNO₃ 90 mmol dm⁻³; 1,0 mL de Tween 20 0,4% (v/v) e 4 mL de H₂O deionizada, submetida três vezes ao vácuo por 1 min. Cada ponto corresponde a média de três repetições *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

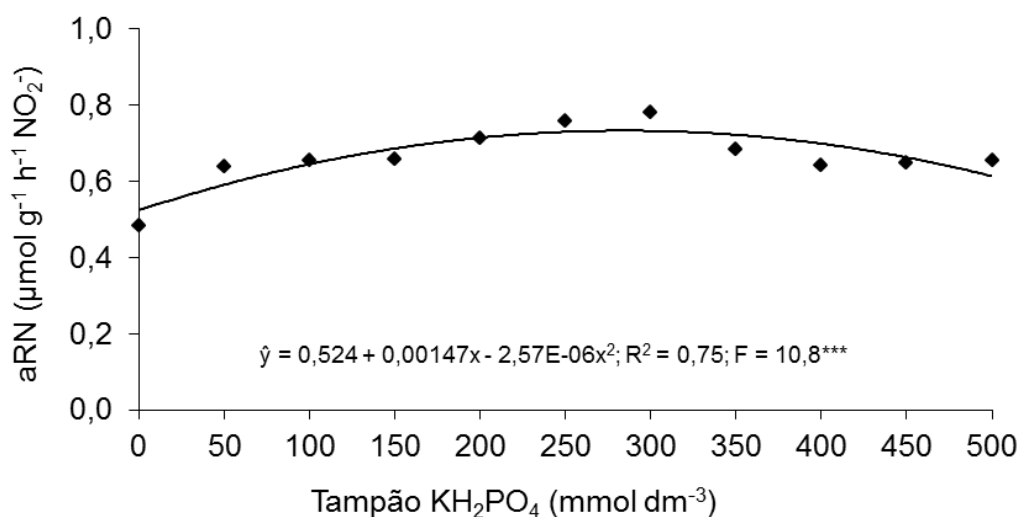


Figura 16. Atividade da RN em função da concentração de fosfato no meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato com pH 7,0; 2,5 mL de KNO₃ 90 mmol dm⁻³; 1,0 mL de Tween 20 0,4% (v/v) e 4 mL de H₂O deionizada, submetida três vezes ao vácuo por 1 min. Cada ponto corresponde a média de três repetições. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

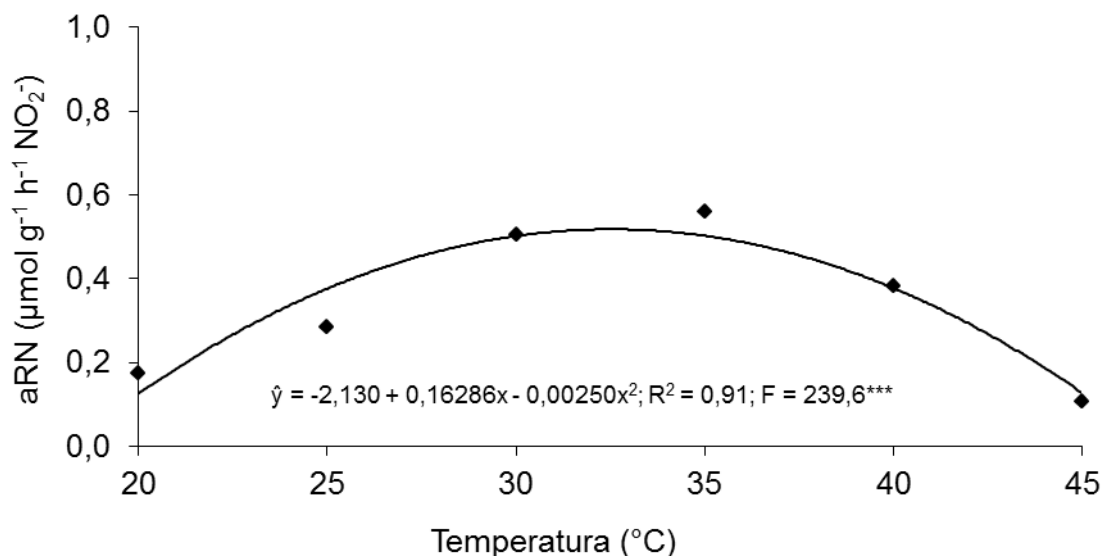


Figura 17. Atividade da RN em função da temperatura do meio de incubação. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 300 mmol dm⁻³; pH 7,0; 2,5 mL de KNO₃ 90 mmol dm⁻³; 1,0 mL de Tween 20 0,4% (v/v) e 4 mL de H₂O deionizada, submetida uma vez ao vácuo por 3 min. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Eficiência da submissão das amostras ao vácuo

A alteração das condições de submissão das amostras ao vácuo não causou efeito na aRN (Figura 18), com isso, a análise pode ser realizada sem o uso do vácuo. Porém, ressalta-se que em virtude das diferenças anatômicas que possivelmente existirão entre cultivares de cana-de-açúcar, uma vez que o presente estudo foi realizado com uma cultivar apenas, seria mais seguro proceder as análises com o uso do vácuo, pois a pressão negativa nas amostras tem a função de retirar o ar contido nos tecidos no momento da análise. Portanto, para os próximos ensaios considerou-se adequado a submissão das amostras ao vácuo em pré-incubação. O modo menos laborioso foi a técnica de submissão de uma vez, por 3 min.

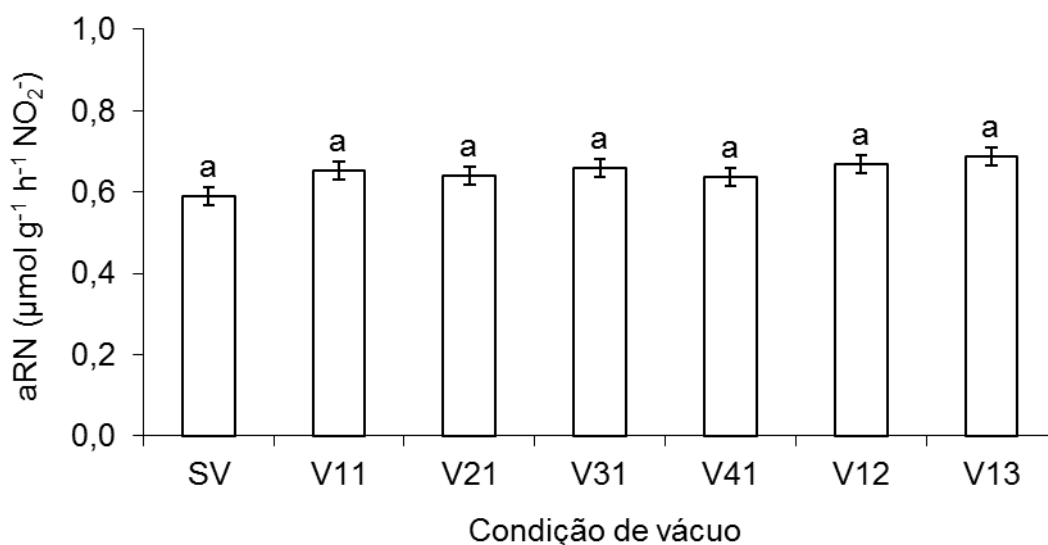


Figura 18. Atividade da RN em diferentes formas de aplicação de vácuo. Discos foliares provenientes da folha +1 de cana-de-açúcar, coletados às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 30 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 300 mmol dm^{-3} pH 7,0; 2,5 mL de KNO_3 90 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 0,4% (v/v) e 4 mL de H_2O deionizada, submetida aplicação de vácuo. SV = sem vácuo; V11 = 1 vez por 1 min; V21 = 2 vezes por 1 min; V31 = 3 vezes por 1 min; V41 = 4 vezes por 1 min; V12 = 1 vez por 2 min e V13 = 1 vez por 3 min. Cada coluna corresponde a média de três repetições. Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tipo de folha e posição de coleta de tecido ao longo da folha

Quanto ao tipo de folha na planta, se observou superioridade estatística dos valores de aRN determinada nas folhas mais jovens (dos tipos 0, +1, +2 e +3) em relação as mais velhas (Figura 19). A posição de coleta de discos ao longo da folha também mostrou influência na aRN, onde, a base apresentou inferioridade estatística comparada às outras partes (Figura 20).

Uma correta amostragem de tecido foliar é essencial para o sucesso de qualquer tipo de análise, com isso, existe a necessidade de se definir o melhor tipo de folha para se proceder a retirada dos discos foliares, além da posição ao longo do limbo foliar. Com base nos resultados (Figuras 19 e 20), o mais indicado seria cortar os discos do ponto médio entre a nervura e borda, da parte mediana (por questões práticas) da folha do tipo +1 (por se tratar da folha recém-madura, ou seja, folha que não é fonte e nem dreno).

Nas condições do presente estudo, a enzima RN apresenta maior atividade nas folhas mais jovens (Figura 19). Em contrapartida, Oliveira e Magalhães (1989), observaram maiores atividades nas folhas mais velhas (+3, +4 e +5), o que pode ter sido devido a algumas diferenças nas condições experimentais, pois o presente trabalho foi desenvolvido a partir da rebrota das plantas (cana-soca), com seis meses de idade, cultivadas em condições de campo, enquanto Oliveira e Magalhães (1989) analisaram cana-planta com três meses de idade, cultivadas em vasos.

A cana-soca é mais responsiva a nitrogênio da solução do solo que a cana-planta (VITTI et al., 2008; JADOSKI et al., 2010). No presente trabalho, as plantas foram analisadas aos 180 dias após o corte, idade esta em que a absorção de nutrientes como o nitrogênio ainda é bastante alta (JADOSKI et al., 2010; SILVEIRA; CROCOMO, 1990) e como estavam no campo, as raízes podem ter absorvido mais nitrato e este, consequentemente ter sido direcionado para os órgãos mais jovens com alta demanda por N. Com isso, maior quantidade de nitrato ficou disponível para a ação da enzima e devido o nitrato ser substrato e indutor da síntese da enzima (CAMPBELL, 1999), a aRN foi maior nas folhas jovens.

Então, pode-se inferir que para as plantas cultivadas em vaso por Oliveira e Magalhães (1989), o N tenha sido mobilizado na forma de N orgânico, não de nitrato (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010), com isso, a menor aRN observada nas folhas mais novas. Adicionalmente, com 90 dias de idade, as plantas de cana-de-açúcar não estavam no período de máxima absorção de N, uma vez que o maior acúmulo de N acontece em torno dos 150 dias após o plantio (SILVEIRA; CROCOMO, 1990).

Outra observação foi que, a enzima apresenta maior atividade na ponta e porção mediana da folha em relação à base (Figura 20). A base, por tratar-se de uma região de crescimento, possivelmente terá suas necessidades em nitrogênio supridas prontamente. Porém, até que se complete a síntese de novas RN a nível suficiente para promover uma alta atividade, a redução de nitrato será mínima, pois além de ser o substrato da enzima, a presença de nitrato nas células também induz a síntese da enzima (CAMPBELL, 1999).

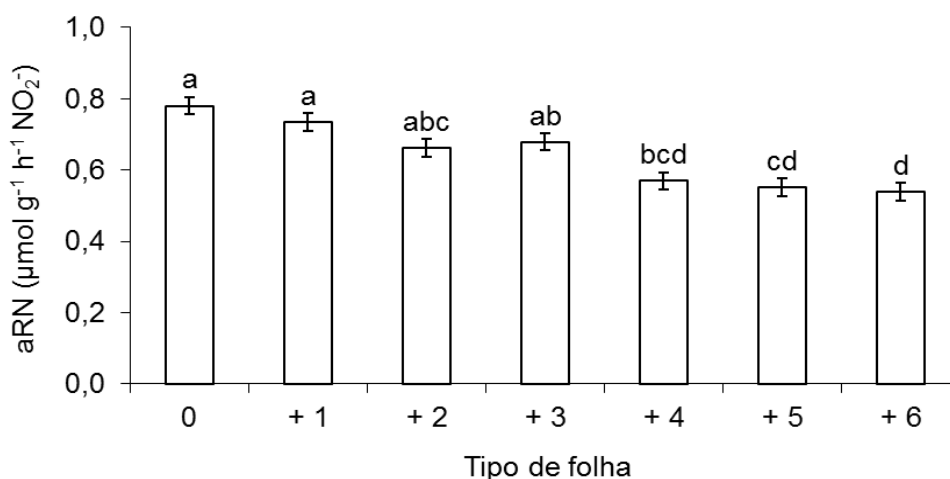


Figura 19. Atividade da RN em função do tipo de folha. Discos foliares coletados de diferentes tipos de folha de cana-de-açúcar às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 35 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 300 mmol dm^{-3} pH 7,0; 2,5 mL de KNO_3 90 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 0,4% (v/v) e 4 mL de H_2O deionizada, submetida uma vez ao vácuo por 3 min. Cada barra corresponde a média de três repetições. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

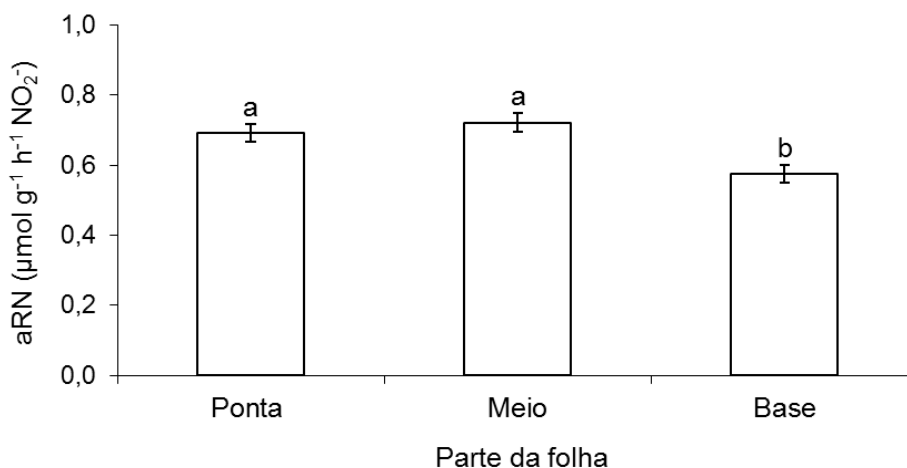


Figura 20. Atividade da RN em função da posição ao longo do tecido foliar. Discos foliares provenientes da folha 0 (zero) de cana-de-açúcar, às 10 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 120 min, a 35 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 300 mmol dm^{-3} pH 7,0; 2,5 mL de KNO_3 90 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 0,4% (v/v) e 4 mL de H_2O deionizada, submetida uma vez ao vácuo por 3 min. Cada barra corresponde a média de sete repetições. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Horário de coleta (folhas 0 e +1)

Em relação à caracterização da aRN em diferentes horários do dia, observou-se que as maiores atividades ocorreram nos períodos mais luminosos, sendo constatado ponto máximo às 13 h tanto na folha do tipo 0 como na do tipo +1 (Figura 21).

Um fator importante e necessário para o sucesso da análise *in vivo* é a definição do horário mais propício para a coleta de folhas no campo, pois a aRN pode variar ao longo do dia devido ao processo de síntese e/ou controle pós-traducional da enzima, e isto, dependendo de condições intrínsecas da planta como também ambientais (KAISER; WEINER; HUBER, 1999; SHARMA; DUBEI, 2005; LILLO, 2008). Os resultados mostram que às 13 h a aRN é máxima em cana-de-açúcar e que o recomendado é realizar a coleta das folhas nos horários entre 10 e 16 h.

Vários fatores são responsáveis pela variação da aRN, dentre eles pode-se citar a quantidade de CO₂ no interior das folhas porém, esta influência é mais marcante em plantas do tipo C3 (FRESNEAU; GHASHGHAIE; CORNIC, 2007). De modo geral, a taxa de CO₂ no ambiente é constante e sendo a cana-de-açúcar uma planta do tipo C4, as taxas fotossintéticas podem ser pouco influenciadas por pequenas variações diárias da umidade do solo ou temperatura (BLACK et al., 2012). Portanto neste caso, as possíveis diferenças de umidade do solo, dada a evaporação diária, pode não ter influenciado tanto a aRN, pois plantas do tipo C4 transpiram pouco. A temperatura do ar também mostrou-se não ser um fator determinante para a aRN no estudo, pois às 10 h (26 °C) e às 16 h (32 °C) a aRN foi a mesma (Figuras 5 e 21).

Dos fatores climáticos observados, a radiação solar global pode ter sido o que mais influenciou a aRN. Os resultados sugerem que a enzima é mais ativa nos horários de maior intensidade dos raios solares (Figuras 5 e 21). A luz é capaz de influenciar tanto a transcrição de RNA mensageiro que codifica a RN, como o controle pós-traducional da enzima (LILLO, 2008). Os baixos níveis de aRN observados no início da manhã como no final do dia, pode estar ligado a um mecanismo de controle rápido da atividade. Kaiser, Weiner e Huber (1999) relatam em sua revisão que na ausência de luz, ocorre a diminuição rápida da aRN, pois

nesta condição a RN é fosforilada e este grupo fosfato, que fica ligado a um resíduo de serina em uma das junções de dois grupos prostéticos da enzima, pode se ligar a proteína 14-3-3, proteína esta presente em plantas de cana-de-açúcar (KURAMAE; FENILLE; ROSA, 2001), que causa a inativação da RN, todavia, uma inativação reversível, pois se ocorrer o estímulo luminoso outra vez, a enzima volta a ficar ativa devido ao desligamento da proteína 14-3-3.

O pico às 13 h, coincide com o ponto de máxima aRN. Resultados semelhantes foram observados em folhas de plantas do tipo C3 que em alta luminosidade também apresentaram maiores reduções de nitrato (LEA et al., 2006; KOŁTON; WOJCIECHOWSKA; LEJA, 2012), diferentemente de folhas de plantas do tipo CAM, como o abacaxizeiro, cuja a enzima RN mostrou-se mais ativa no início da manhã (FRESCHI et al., 2009).

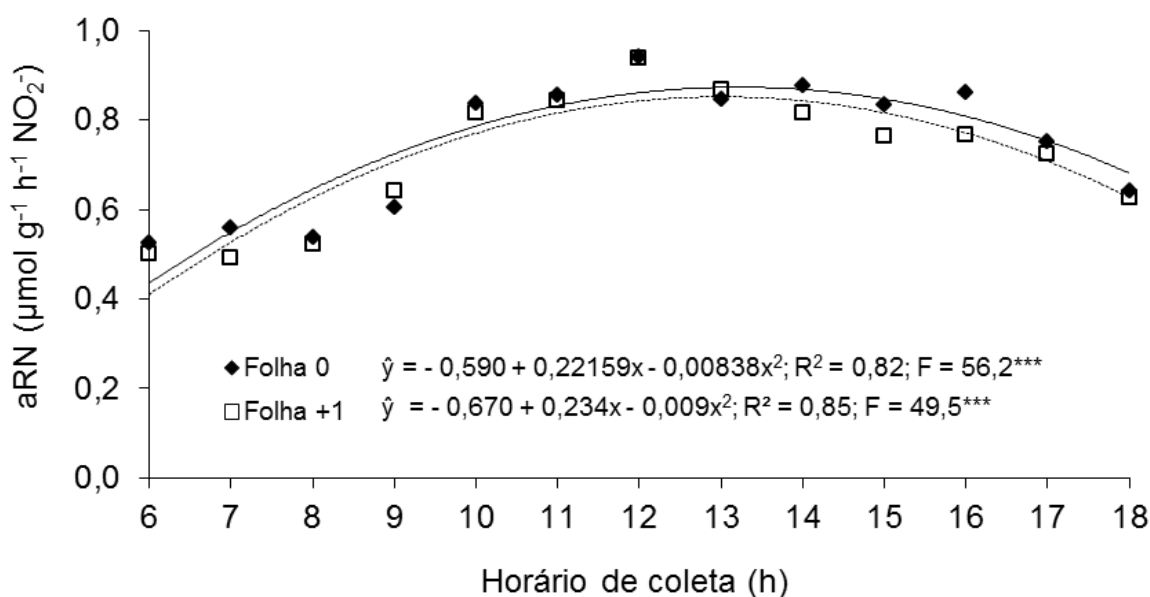


Figura 21. Atividade da RN em função do horário do dia. Discos foliares provenientes do terço médio das folhas 0 (zero) e +1 de cana-de-açúcar, ao longo do dia. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 90 min, a 32 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 285 mmol dm^{-3} pH 7,3; 2,5 mL de KNO_3 300 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 0,6% (v/v) e 4 mL de H_2O deionizada, submetida uma vez ao vácuo por 3 min. Cada ponto corresponde a média de três repetições. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade.

Uso de vácuo e/ou solvente

Os resultados só mostraram a existência de diferença estatística entre os tratamentos 1 (Água + vácuo 3 min) e 6 (n-propanol + vácuo 3 vezes +1 min), sendo este tratamento inferior (Figura 22), com isso, o ensaio serviu para reafirmar que, não existe a necessidade de utilização de solvente e ou vácuo na análise de tecidos de cana-de-açúcar, conforme observado também nas Figuras 10 e 18.

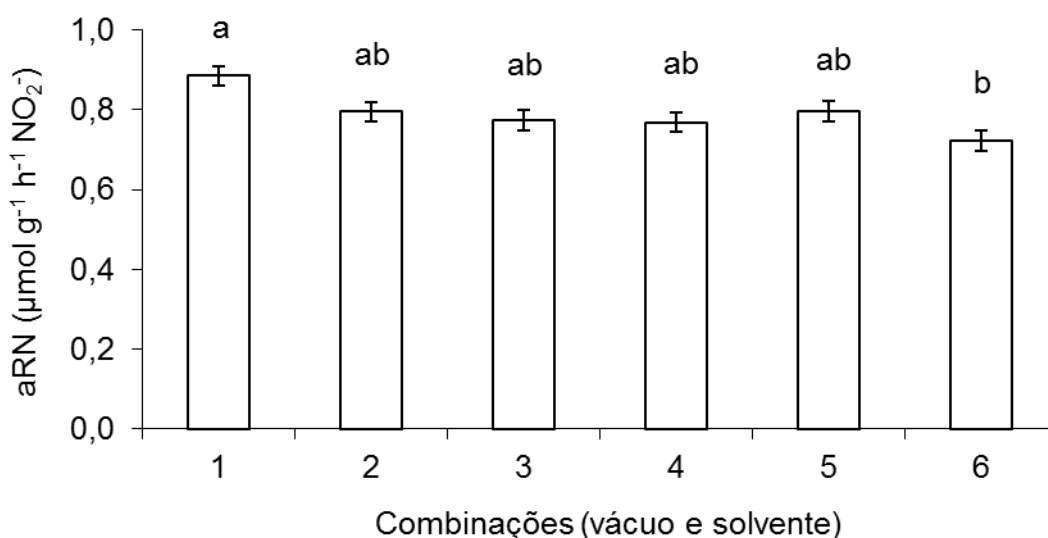


Figura 22. Atividade da RN em função de combinações entre aplicação de solvente e submissão ao vácuo. Discos foliares provenientes do terço médio da folha 0 (zero) de cana-de-açúcar, às 13 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 90 min, a 32 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 285 mmol dm⁻³ a pH 7,3; 2,5 mL de KNO₃ 300 mmol dm⁻³ 1,0 mL de Tween 20 0,6% (v/v), 1,5 mL de H₂O deionizada e 2,5 mL de combinações de adição ou não de n-propanol a 1% (v/v) e submetida ou não ao vácuo de 600 mm Hg. 1 = Água + vácuo 3 min; 2 = Água + sem vácuo; 3 = n-propanol 1% + vácuo 3 min; 4 = n-propanol 1% + sem vácuo; 5 = água + vácuo 3 vezes + 1 min; 6 = n-propanol + vácuo 3 vezes +1 min. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Avaliação da aRN ao longo do ciclo da cana-de-açúcar (folhas 0 e +1)

A altura das plantas comportou-se de modo linear em relação às avaliações mensais, atingindo 2,97 m no último mês de análise (Figura 23).

Quanto a variabilidade da aRN ao decorrer do ciclo da cultura, verificou-se decréscimo, com 92 e 95% de ajustes a uma curva do tipo quadrática para as folhas

do tipo 0 e +1, respectivamente (Figura 23). Para a folha do tipo +1, o ponto de mínima atividade da RN foi observado na fase de maturação, enquanto, para a folha do tipo 0 no final do crescimento, as maiores aRN foram notadas logo no início da fase de perfilhamento.

Para se proceder a coleta de material vegetal no campo é importante saber a melhor época ao longo do ciclo da cultura, pois além de fatores internos da planta, o nível de atividade da enzima é influenciado pelas condições ambientais nas quais as plantas estão sendo cultivadas. A caracterização da aRN nas folhas de cana-de-açúcar nos diferentes estádios, juntamente com a medida de variáveis climáticas, ainda não está esclarecida e as presentes interpretações podem incitar futuras discussões. De modo geral, o estudo mostrou que à medida que as plantas crescem, a aRN diminui, isto até o início da fase de maturação (Figura 23), o que sugere que a estimativa da aRN pode ser realizada durante o período de crescimento das plantas.

A coleta das folhas para a análise, na época de início de perfilhamento, assim como na brotação, pode ser dificultada, pois as folhas ainda estão muito estreitas, o que impede o corte em discos. Não mostrou ser viável a coleta de folhas na fase de maturação, pois a aRN nesta fase é muito baixa, possivelmente devido a baixa absorção de nitrogênio.

O acompanhamento mensal da aRN, teve início no segundo mês após o corte da segunda soqueira da lavoura usada no estudo (janeiro de 2012). As plantas estavam com cerca de 20 cm de altura, na fase de perfilhamento, em plena época de verão brasileiro (Figura 6). A alta aRN observada nesta fase, pode ser explicada pelas condições climáticas favoráveis à produção da enzima pela planta e/ou pelo fato de que, as plantas estavam pequenas até então e independente da quantidade de nitrato disponível na solução do solo, este teria sido suficiente para nutri-las adequadamente. Além de que, a síntese de RN na planta é induzida pela presença de nitrato na planta (CAMPBELL, 1999).

A partir do mês de abril, as plantas estavam no estágio de crescimento da parte aérea e iniciou-se o outono. O decréscimo da aRN observado pode estar relacionado aos fatores climáticos (Figura 6), como a diminuição da luminosidade, temperatura e precipitação pluviométrica, condições estas, que não são favoráveis à

plantas com metabolismo do tipo C4 (TAIZ; ZEIGER, 2004). As menores aRN foram observadas na época do ano em que, as variáveis climatológicas apresentaram valores mínimos (Figura 6). Também é possível que a planta não tenha absorvido a quantidade de nitrato necessária para sua adequada nutrição nesta época, uma vez que as raízes retiram o nitrato da solução do solo (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010) e, no período que as plantas mais precisavam de água, houve uma severa escassez de chuvas na região (Figura 6), o que pode ter influenciado negativamente na absorção de nitrogênio.

Contudo, resultados de um estudo realizado em condições de campo no Brasil, com cana-planta sob altas doses de N e vinhaça, demonstrou que a aRN foi maior nos estádios iniciais, decresceu acentuadamente até o início da maturação e, estes valores baixos se estabilizaram até o final do ciclo da cultura (SILVEIRA; CROCOMO, 1990), sugerindo então, no atual estudo, uma maior influência do nível de aRN por fatores climáticos do que pela quantidade de N disponível no solo. No estudo de Silva (1989), que também realizou um acompanhamento mensal da aRN em plantas de cana-de-açúcar adubadas com uréia (janeiro a agosto), porém na cultura cana-planta, foi observado o decréscimo nos níveis de atividade do início ao fim do período estudado. Contudo, não observaram correlações significativas da aRN com o teor de NO_3^- no solo e nem foliar. Na ocasião, atribuíram os resultados a componentes genéticos e às condições de estresse existentes, como a queda no potencial hídrico, por exemplo.

No último mês de avaliação, as plantas estavam no estágio de maturação e apesar dos fatores climáticos se encontrarem propícios para uma maior expressão da RN (Figura 6), a atividade da enzima apresentou valor mínimo (Figura 23), assim, há um forte indicativo de que, a planta diminui a absorção de nitrogênio nesta fase, por questões endógenas da planta (genético-fisiológico), portanto não é indicado a análise da aRN em plantas com a maturidade fisiológica atingida.

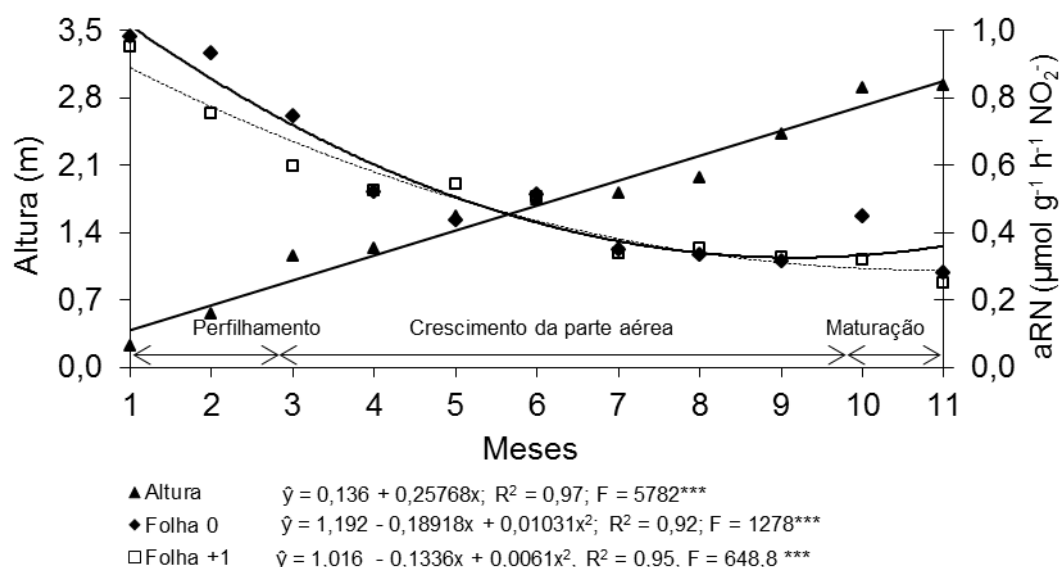


Figura 23. Evolução da altura de plantas de cana-de-açúcar e atividade da RN nas folhas dos tipos 0 (zero) e +1 em função do tempo após o corte. Discos foliares provenientes do terço médio das folhas 0 e +1, coletados às 13 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 90 min, a 32 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 285 mmol dm⁻³ pH 7,3; 2,5 mL de KNO₃ 300 mmol dm⁻³; 1,0 mL de Tween 20 0,6% (v/v) e 4 mL de H₂O deionizada, submetida uma vez ao vácuo por 3 min. Cada ponto corresponde a média de quatro e dez repetições para aRN e altura, respectivamente. *** - significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Procedimento de lavagem das folhas

Em análise de tecido foliar para determinação de nutrientes, recomenda-se a lavagem das folhas com solução detergente e HCl para retirada de possíveis contaminantes (EMBRAPA, 2009). Com base nisto, realizou-se um teste para verificar se a lavagem dos tecidos iria interferir na determinação da aRN, uma vez que, é possível que a aplicação destas substâncias na folha possa alterar a permeabilidade das membranas. Os resultados não mostraram diferença estatística entre os tratamentos testados (Figura 24), com isso, as análises podem ser realizadas sem a lavagem prévia dos tecidos.

Nas condições do presente estudo não houve qualquer tipo de aplicação de produtos químicos foliares nas plantas e as folhas estavam com a superfície visivelmente limpa. Entretanto, para coletas em lavouras comerciais com folhas empoeiradas ou que receberam a aplicação de agroquímicos, seria pertinente a lavagem dos tecidos, que pode ser realizada conforme Embrapa (2009).

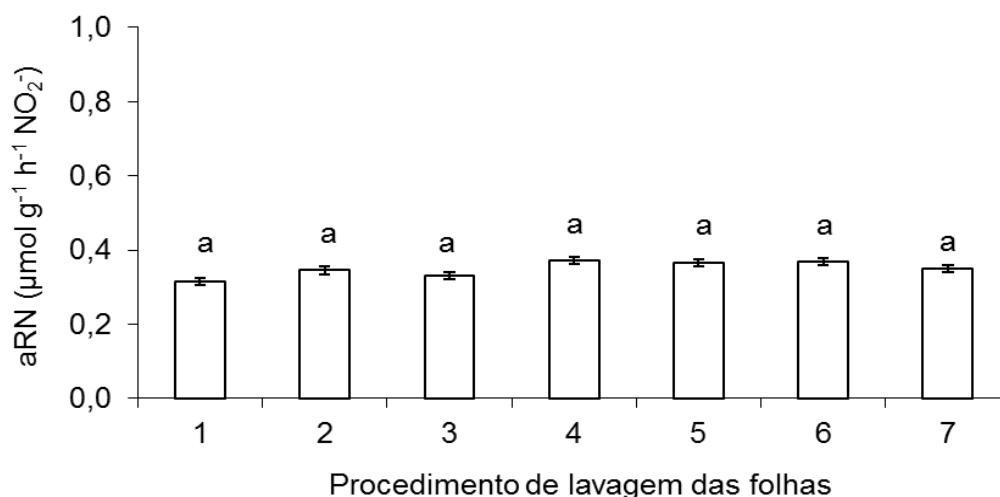


Figura 24. Atividade da RN em função do procedimento de lavagem das folhas. Discos foliares provenientes do terço médio da folha 0 (zero) de cana-de-açúcar, às 13 h. Cada amostra de 500 mg foi incubada por 90 min, a 32 °C no escuro, em 2,5 mL de tampão fosfato 285 mmol dm⁻³ pH 7,3; 2,5 mL de KNO₃ (300 mmol dm⁻³); 1,0 mL de Tween 20 0,6% (v/v) e 4 mL de H₂O deionizada, submetida uma vez ao vácuo por 3 min. 1 = folhas sem lavagem; 2 = folhas com lavagem + H₂O deionizada + secagem com papel toalha; 3 = folhas com lavagem + H₂O deionizada + úmidas; 4 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + H₂O deionizada + secagem com papel toalha; 5 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + H₂O deionizada + úmidas; 6 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + HCl (0,3% v/v) + H₂O deionizada + secagem com papel toalha; 7 = folhas com lavagem + detergente (0,1% v/v) + HCl (0,3% v/v) + H₂O deionizada + úmidas. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

2.4 Conclusões

O procedimento de análise mais adequado para estudar a atividade da enzima RN em cana-de-açúcar é coletar as folhas do tipo +1 durante o estágio fenológico de crescimento, às 13 h; cortar 25 discos foliares de 1 cm de diâmetro (500 mg) do ponto médio entre nervura e borda do terço médio da folha; adicionar os discos foliares em 10 mL de meio preparado com 2,5 mL de KNO₃ 300 mmol dm⁻³; 2,5 mL de tampão KH₂PO₄ 285 mmol dm⁻³ pH 7,3; 1,0 mL de Tween 20 a 0,6% (v/v) e 4,0 mL de água deionizada; submeter ao vácuo de 600 mm Hg, uma vez, por três minutos e incubar por 90 min, a 32 °C no escuro.

2.5 Referências

- ABAYOMI, Y. A.; ETEJERE, E. O.; FADAYOMI, O. Effect of nitrogen level and water deficit on nitrate reductase activity NRA from leaves of two sugarcane cultivars - Co 957 1001. **Turrialba**, San Jose, v. 38, n. 4, p. 352-358, 1988.
- AHMAD, S.; FAZILI, I. S.; HAQUE, R.; KHAN, S. N.; ABDIN, M. Z. Standardization and estimation of nitrate reductase activity in the leaves of *Ammi majus* L. (*Bishops weed*) in relation to sulphur deficiency and seed yield. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, n. 7, p. 515-522, 2010.
- BAR-AKIVA, A.; SAGIV, J.; LESHEM, J. Nitrate reductase activity as an indicator for assessing the nitrogen requirement of grass crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 405-407, 1970.
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R. H. Nitrate reduction in higher plant. **Annual Review of Plant Physiology**, Saskatchewan, v. 20, n. único, p. 495-522, 1969.
- BLACK, E.; VIDALE, P. L.; VERHOEF, A.; CUADRA, S. V.; OSBORNE, T.; VAN DEN HOOFF, C. Cultivating C4 crops in a changing climate: sugarcane in Ghana. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 7, n. 4. doi.org/10.1088/1748-9326/7/4/044027, 2012.
- BOBADE, S. N.; KHYADE, V. B. Influence of inorganic nutrients on the activity of enzyme, nitrate reductase in the leaves of mulberry, *Morus alba* (L) (M-5 variety) **Research Journal of Recent Sciences**, Indore, v. 1, n. 5, p. 14-21, 2012.
- CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging te gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 277-303, 1999.
- CARLIN, S. D.; RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. S D. Efeito simultâneo da deficiência hídrica e do alumínio tóxico no solo na cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 553-564, 2012.
- CAZETTA, J. O.; VILLELA, L. C. V. Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 6, p. 640-648, 2004.
- CHANDA, S. V. Factors affecting nitrate reductase activity in some monocot and dicot species. **Journal of Plant Biology**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 41-45, 2003.
- CRUZ, F. J. R.; LOBATO, A. K. S.; COSTA, R. C. L.; LOPES, M. J. S.; NEVES, H. K. B.; OLIVEIRA NETO, C. F.; SILVA, M. H. L.; SANTOS FILHO, B. G.; LIMA JUNIOR, J. A.; OKUMURA, R. S Aluminum negative impact on nitrate reductase activity, nitrogen compounds and morphological parameters in sorghum plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 641-645, 2011.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, E. S.; FRANÇA, J. G. E.; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

EL-KOMY, H. M.; HAMDIA, M. A.; EL-BAKI, G. K. A. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 2, p. 281-287, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: CNPS, 2006. 306 p.

FRESCHI, L.; NIEVOLA, C. C.; RODRIGUES, M. A. R.; DOMINGUES, D. S.; VAN SLUYS, M. A.; MERCIERA, H. Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, n. 3, p. 201-212, 2009.

FRESNEAU, C.; GHASHGHAIE, J.; CORNIC, G. Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO₂. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 11, p. 2983-2992, 2007.

GALLO, J. R.; ALVAREZ, R.; ABRAMIDES, E. Amostragem em cana-de-açúcar, para fins de análise foliar. **Bragantia**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 899-921, 1962.

ISHIKAWA, S.; ANDO, S.; SAKAIGAICHI, T.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate-N concentration of sugarcane, **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 55, n. 4, p. 485-495, 2009.

JADOSKI, C. J.; TOPPA, B. E. V.; JULIANETTI, A.; TARCISIO HULSHOF, T.; ONO, E. O., RODRIGUES, J. D. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 3, n. 2, p. 169-176, 2010.

JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Permeabilization of cell membranes. In: _____ (Ed.) **Immunocytochemical methods and protocols**, 3. ed., Totowa: Humana Press, 2010. v. 588, p. 63-66.

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

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

KOŁTON, A.; WOJCIECHOWSKA, R.; LEJA, M. The effect of various light conditions and different nitrogen forms on nitrogen metabolism in pepper fruits. **Folia Horticulturae**, Kraków, v. 24, n. 2, p. 153-160, 2012.

KURAMAE, E. E.; FENILLE, R. C.; ROSA, V. E. Identification of 14-3-3-like protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 43-48, 2001.

LAVON, R.; GOLDSCHMIDT, E. E. Enzymatic methods for detection of mineral element deficiencies in citrus leaves: a mini-review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, n. 1, p. 139-150, 1999.

LEA, U. S.; LEYDECKER, M. T.; QUILLERÉ, I.; MEYER, C.; LILLO, C. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence, **Plant Physiology**, Waterbury, v. 140, n. 3, p. 1085-1094, 2006.

LEMAÎTRE, T.; GAUFICHON, L.; BOUTET-MERCEY, S.; CHRIST, A.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassilewskija Accession. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 7, p. 1056-1.65, 2008.

LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. **Biochemical Journal**, London, v. 415, n. 1, p. 11-19, 2008.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J.; REIS, V. M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 961-970, 1998.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture, **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 7, p. 1141-1157, 2010.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Sofia, v. 1, n. 3, p. 386-414, 2012.

MILLER, S. A. Minimizing land use and nitrogen intensity of bioenergy. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3932-3939, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. In: _____ (Ed.). **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Worth, 2004. cap. 6. p. 190-237.

OLIVEIRA, L. E. M.; MAGALHÃES, A. C. N. Atividade da redutase do nitrato in vivo em folhas de cana-de-açúcar em função das variações nas condições ensaio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 437-443, 1989.

OLIVEIRA, M. A. J.; 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, p. 515-522, 2005.

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. p. 231-244. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M. E.; LOPES, A. S.; BATAGLIA, O. C. **Análise química do solo para fins de fertilidade**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 170 p.

SCHEURWATER, I.; KOREN, M.; LAMBERS, H.; ATKIN, O. K. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing Grass species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 374, p. 1635-1642, 2002.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 8, p. 854-864, 2005.

SILVA, E. F. **Efeito da adubação nitrogenada sobre a variação estacional das frações nitrogenadas, atividade da nitrato-redutase, e carboidratos solúveis em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp, cv. NA 56-79), em condições de campo**. 1986. 163 f. Dissertação, (Mestrado em Agronomia-Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, 1986.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de n e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 7-15, 1990.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L M; FERNANDES, M. S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Artware Projetos Culturais, 2002. V. 1 55 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VILLALOBOS, E.; CARVAJAL, J. F. Um método para analizar la actividad de la reductasa del nitrato em condiciones de campo. **Revista Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 2, n. 1, p. 69-81, 1978.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETTO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 239-269.

3 CAPÍTULO 3 – Dinâmica da atividade da redutase do nitrato após adubação nitrogenada de cana-de-açúcar

RESUMO – Devido às particularidades das fontes nitrogenadas quanto à dinâmica no solo, a absorção de N pela cana-de-açúcar é influenciada, o que pode alterar os níveis de atividade da RN nas folhas em função do tempo após a adubação. O objetivo deste capítulo foi acompanhar, ao decorrer do tempo após a adubação nitrogenada, a variação dos níveis de atividade da RN e obtenção de nitrogênio por plantas de cana-de-açúcar deficientes do nutriente. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, usando como substratos dos vasos: amostra de solo de um Latossolo vermelho de textura argilosa (experimento 1), areia mais vermiculita na proporção de 2:1 (v/v) (experimento 2) e mistura de areia, terra e vermiculita na proporção de 2:1:1 (v/v) (experimento 3), sendo que, todos os substratos tiveram a fertilidade devidamente corrigida. Os vasos de 4 dm³ foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados, com 4 repetições no experimento 1 e três nos experimentos 2 e 3. As coletas das plantas foram realizadas ao passar dos dias após a adubação nitrogenada com a dose de 50 mg dm⁻³ aplicada na forma de solução de uréia nos experimentos 1 e 2. Já no experimento 3, avaliou-se, além da uréia, as fontes sulfato de amônio e nitrato de amônio. As variáveis avaliadas foram: atividade da RN, massa seca de parte aérea e de sistema radicular, teor e acúmulo de N na parte aérea e altura de plantas. Os resultados mostraram que a atividade da enzima RN é máxima por volta dos 13 dias após a aplicação da uréia em plantas de cana-de-açúcar deficientes em N, mostraram ainda que, a dinâmica de absorção de N proveniente da uréia se altera em função da textura do substrato e nível de deficiência de N das plantas, e que também, plantas em condições de deficiência de N apresentam a mesma dinâmica de absorção de N e de atividade da RN, até os 20 dias da adubação, independente das fontes avaliadas no presente estudo. Sendo que, com o uso da fonte uréia a absorção de N se dá um pouco mais rápido, e a atividade da RN é aumentada mais rapidamente com a aplicação de nitrato de amônio.

Palavras-Chave – *Saccharum* spp., absorção de nitrogênio, fontes nitrogenadas, nitrato de amônio, sulfato de amônio, uréia

3.1 Introdução

No Brasil, a quantidade total de fertilizantes nitrogenados usados na cultura da cana-de-açúcar é de aproximadamente 613 mil toneladas (ROBINSON et al., 2011), dentre as quais, as fontes de N mais usadas são: uréia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] que apresenta 45-46% de N na forma amídica, nitrato de amônio (NH_4NO_3) com 33% de N nas proporções 1:1 dos íons NO_3^- e NH_4^+ e sulfato de amônio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] com 21% de N na forma de NH_4^+ (CANTARELLA, 2007).

O N é o nutriente que mais onera o custo de produção da cana-de-açúcar, porém, é muito importante a promoção de sua disponibilidade para a cultura, uma vez que juntamente com o potássio, é o nutriente mais extraído pela cana-de-açúcar (MALAVOLTA, 2006). Em experimento com plantas cultivadas em solução nutritiva, Vale et al. (2011) constataram que o nitrogênio e o fósforo são os nutrientes que mais limitam o crescimento de plantas de cana-de-açúcar. No mesmo estudo, também observaram menores incrementos de raízes na falta de N e Ca.

Além do manejo correto do nutriente, para a garantia de produtividade, é de suma importância no planejamento da adubação, a escolha da fonte nitrogenada, pois, grande parte do N aplicado não é aproveitada pelas plantas em função da forma química na qual se encontra. A uréia, por exemplo, sofre grandes perdas por lixiviação, desnitrificação e principalmente por volatilização (CANTARELLA, 2007) e, por este processo estar ligado a atividade da enzima urease, que é produzida por microrganismos do solo, os fatores como concentração do substrato, umidade, temperatura e pH do solo determinam seu nível de atividade (OKUMURA; MARIANO, 2012), bem como, a mineralização do adubo até as formas químicas absorvíveis pelas plantas é dependente de diversos fatores ambientais (MILLER; CRAMER, 2004).

Nas condições brasileiras, a maior parte dos estudos sobre recuperação de N do fertilizante na cultura da cana-de-açúcar foi realizada com a fonte uréia, obtendo-se como resultados valores de N recuperado pelas plantas entre 7 e 63%, conforme vários autores citados por Cantarella (2007) e Vitti et al. (2008). Franco et al. (2008) observaram que o N absorvido da uréia representou em média 11,7% do N total acumulado na planta toda. No mesmo trabalho, citam autores que observaram 21 a

27%, 48% e 23% de recuperação de N ao usarem as fontes sulfato de amônio, nitrato de amônio e nitrato de potássio, respectivamente.

Por ocasião da absorção, as proteínas transportadoras para as diferentes fontes, podem apresentar alta ou baixa afinidade pelos substratos (NO_3^- e NH_4^+) em função da concentração no meio (TISCHNER, 2000; SOUZA et al., 2006; SOUZA; FERNANDES, 2006). Em solos tropicais, como é o caso dos brasileiros, a disponibilidade do íon NO_3^- é bem maior que a do íon NH_4^+ , com isso, maior quantidade de nitrato é absorvido pelas plantas (MALAVOLTA, 2006), mesmo que, plantas de cana-de-açúcar apresentem preferência em absorver amônio à nitrato em condições de similaridade nas concentrações (ROBINSON et al., 2011). O que pode estar ligado a maior afinidade dos transportadores por este íon, ou ainda, porque o amônio é absorvido por canal iônico sem gasto energético direto, e o transporte transmembrana do nitrato requer energia (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000; PRADO, 2008).

Lara Cabezas e Couto (2007) quantificaram, por meio de ^{15}N , tanto o nitrogênio imobilizado no solo como o recuperado depois da adubação com uréia e sulfato de amônio em plantas de milho, em diferentes estádios do desenvolvimento. Observaram que, com o uso do N na forma amoniacal, a ciclagem do N imobilizado foi maior, tendo como consequência uma maior absorção, resultados semelhantes foram observados por Lange, Lara Cabezas e Trivelin (2010). Lara Cabezas e Couto (2007) observaram ainda, que os maiores acúmulos ocorreram um pouco antes e durante o florescimento. Num estudo com cana-de-açúcar adubada com diferentes fontes nitrogenadas em sistema de colheita sem despalha à fogo, quantificou-se as perdas por volatilização da amônia, e observou-se que até os seis primeiros dias após aplicação dos tratamentos ocorreram as maiores perdas (COSTA; VITTI; CANTARELLA, 2003).

Por haver diferenças entre a absorção das diferentes fontes de N, a RN, que é a enzima limitante da assimilação de nitrogênio em plantas (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012), pode apresentar flutuações nos níveis de atividade e isto, dependendo do tempo após a adubação nitrogenada.

Alguns estudos com plantas de tabaco e cevada mostraram que a atividade da RN (aRN) é maior quando em presença de nitrato à amônio no meio (VAUCHERET, H.; CABOCHE, 1995; SAMUELSON et al., 1995).

Na planta arbórea *Juglans nigra* também foi observado maiores aRN com o uso da fonte nitrato (NaNO_3) em relação ao amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. A fonte que apresentava as duas formas (NH_4NO_3) induziu a aRN de forma intermediária (NICODEMUS; SALIFU; JACOBS, 2008).

A atividade da RN em folhas de plantas de *Vernonia herbácea* não diferiu até os três meses da aplicação das fontes KNO_3 , NH_4NO_3 e $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, porém, após este período, precisamente aos quatro meses após a aplicação, a fonte nitrato de potássio induziu maior atividade da enzima (CARVALHO et al., 2006).

Em estudos com cana-de-açúcar, na Nigéria, Abayomi, Etejere e Fadayomi (1988), utilizando a fonte nitrocálcio, observaram maiores atividades da RN aos dois meses que aos quatro após o plantio. Neste mesmo segmento, Silva (1989) e Silveira e Crocomo (1990), no Brasil, também observaram a redução da atividade da RN em cana-de-açúcar ao decorrer do tempo após a aplicação da uréia.

Vieira, Trivelin e Megda (2010) avaliaram em condições de campo, o efeito residual de fontes de N na atividade da RN de folhas de cana-de-açúcar e observaram que, aos dois meses após a adubação, as fontes nitrato de amônio e cloreto de amônio foram as que induziram a maior aRN, comparadas as fontes sulfato de amônio e uréia. No mesmo estudo, também constatarem variações da aRN em função do tempo após a adubação, indicando que, em plantas de cana-de-açúcar, a aRN responde de maneira peculiar a cada tipo de fonte nitrogenada.

Ainda não se tem na literatura, dados sobre respostas da aRN em curto período após a aplicação de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar deficientes do nutriente. Com isso, o objetivo foi acompanhar, ao decorrer do tempo após a adubação nitrogenada, a variação dos níveis de atividade da RN e obtenção de nitrogênio por plantas de cana-de-açúcar deficientes do nutriente.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostras de solo)

Instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (coberta com vidro) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP em Jaboticabal - SP (FCAV/UNESP) entre os meses de junho e outubro de 2011. Os tratamentos consistiram de sete momentos de avaliação da atividade da redutase do nitrato (aRN) após a aplicação de solução de uréia na superfície do solo aos 0, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 dias. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, perfazendo um total de 28 unidades experimentais (parcelas). Cada parcela foi composta por uma planta de cana-de-açúcar, crescida em vaso com 4 dm³ de amostras de solo. O cultivo no substrato composto por amostra de solo teve a intenção de proporcionar uma condição onde a uréia ficasse mais passível a ação microbiana e enzimática do solo. A cultivar usada foi a IACSP93-3046, cultivar esta, que apresenta boas perspectivas de utilização no moderno sistema de “colheita mecânica crua”.

Quanto ao preparo das parcelas, num primeiro momento, foram produzidas as mudas (abril a junho de 2011). Na ocasião, os colmos obtidos de um plantio localizado na FCAV/UNESP (Lat. 21° 15' 22" S e Lon. 48° 18' 58" W, alt. 575 m), foram cortados, deixando-se uma gema por tolete de 5 cm de comprimento. Em seguida, os mini-toletes foram tratados termicamente conforme Copersucar (1989) e germinados em copos de 0,5 dm³ preenchidos com areia de granulometria fina.

Cinquenta dias depois, as plantas com 7 cm de altura (da base até a inserção da folha +1), consideradas uniformes, foram transplantadas para os vasos definitivos (Figura 1). Os vasos continham terra proveniente dos primeiros 20 cm de um Latossolo Vermelho eutrófico (EMBRAPA, 2006), com textura argilosa, localizado nas proximidades do aeroporto municipal de Jaboticabal (Lat. 21° 13' 48" S e Lon. 48° 17' 05" W). Uma amostra de solo foi enviada ao laboratório de fertilidade do solo do Departamento de Solos e Adubos da FCAV/UNESP, onde foi analisada conforme

metodologia descrita em Raji et al. (1987). A amostra apresentou as propriedades químicas expostas na Tabela 1A.



Figura 1. Muda produzida a partir de mini-tolete de cana-de-açúcar sendo transplantada para o vaso definitivo

Tabela 1. Características químicas das amostras dos substratos utilizados no cultivo da cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação

da cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação									
pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³ -----						%
(a)									
5,0	15	28	1,3	25	10	31	36,3	67,3	54
(b)									
6,5	3	5	0,5	5	64	7	69,5	76,5	91
(c)									
6,3	4	5	0,6	8	50	9	58,6	67,6	87

(A) = substrato composto por amostra de solo usado no experimento 1. (B) =, substrato areia mais vermiculita na proporção de 2:1 (v/v) usado no experimento 2. (C) = substrato composto por amostra de solo, areia mais vermiculita na proporção de 1:2:1(v/v) usado no experimento 3. M.O. = matéria orgânica, SB = soma de bases, CTC = capacidade de trocas catiônicas, V = saturação por bases.

Com finalidade de elevar a saturação por bases (V%) a 60, conforme recomendação de Raji e Cantarella (1997) para a cultura da cana-de-açúcar, incorporou-se à massa de solo peneirada o equivalente a 155 mg dm⁻³ de calcário (CaO = 42%; MgO = 25% e PRNT = 131%). Em seguida colocou-se a massa de solo em uma caixa de amianto, onde permaneceu úmida por período de 30 dias para que o calcário exercesse seu efeito neutralizador. Após esse período, a terra foi seca

naturalmente, peneirada e adubada. Misturou-se o equivalente a 40 e 60 mg dm⁻³ de P₂O₅ e K₂O na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio respectivamente, ressaltando que o nitrogênio só foi aplicado posteriormente, após a primeira coleta (tratamento Dia 0). Utilizou-se como fonte nitrogenada a uréia, pois é a fonte mais utilizada nos canaviais brasileiros.

Aos 80 dias após o transplante, estando as folhas basais um pouco cloróticas, o que sugeriu deficiência de nitrogênio, foi feita a aplicação de solução de uréia via solo, contendo 50 mg dm⁻³ (equivalente a 100 kg ha⁻¹ de N, dose esta, comumente utilizada em canaviais comerciais), com exceção das parcelas referentes ao tratamento Dia 0.

Durante a condução do experimento procedeu-se com frequência a capina manual de eventuais plantas provenientes do banco de sementes do solo. A irrigação foi feita diariamente com base no método de pesagem dos vasos (MELO et al., 1998). Procurou-se sempre manter a umidade a 60% da capacidade de campo. A cada 15 dias era feito o rodízio dos vasos para evitar possíveis influências do ambiente, sendo mantida entre cada vaso, uma distância de cerca de 10 cm. Para evitar a proliferação de lagartas, as plantas eram inspecionadas regularmente e fazia-se a catação manual. Caso apresentassem indícios de presença de ácaros, eram limpas com pano embebido em solução detergente e posterior retirada do excesso com pano encharcado com água.

Coleta do experimento e preparo das amostras

A idade das plantas (desde a emergência) no momento da coleta era de 146 dias. Em cada dia de avaliação foi obtida a altura das plantas. Tomou-se como medida o comprimento entre o “colo” da planta e o ponto de inserção da folha do tipo +1. As folhas do tipo 0 (zero) foram coletadas, sendo estas reservadas em caixa de isopor com gelo para a determinação da aRN. Em seguida, fez-se o corte basal das plantas. O material vegetal foi então lavado com solução detergente e em seguida enxaguado com água deionizada. As raízes foram separadas do substrato por lavagem em água corrente.

As amostras obtidas foram individualizadas em sacos de papel e levadas para estufa de circulação fechada, na qual permaneceram sob a temperatura de 65

°C até os valores ficarem constantes nas pesagens. Após isso, procedeu-se a pesagem em balança analítica, para a obtenção dos valores de biomassa seca da parte aérea e sistema radicular, ressaltando que, se obtiveram separadamente as massas de tolete remanescente e raiz. Em seguida a parte aérea foi triturada em moinho com câmara de aço inoxidável e guardadas, para posterior análise do teor total de nitrogênio.

Determinações analíticas na parte aérea das plantas

Atividade da redutase do nitrato (aRN)

A aRN foi determinada usando o método previamente padronizado, descrito no Capítulo 2, que consistiu na coleta da folha do tipo 0, às 13 horas, levando-as imediatamente para o laboratório, onde procedeu-se as análises. Ressalta-se que, devido a uma pequena quantidade de material vegetal disponível, utilizou-se toda a folha, com exceção da nervura principal. A folha analisada foi a do tipo 0, pois esta estava maior que a folha do tipo +1 (precisava de maior volume para a análise, contudo seria interessante ter se realizado com a folha do tipo +1, mas não foi possível). Também não foi possível o corte com furador de rolha, com isso, o tecido foliar foi cortado com tesoura em secções de aproximadamente 0,5 cm. Pesou-se em balança analítica 500 mg de tecido foliar por amostra, sendo estas colocadas em frascos escuros, e, devido ao tempo de preparo entre cada amostra, manteve-se os frascos com as amostras dentro de uma caixa de isopor com gelo até a adição do meio de incubação. Todas as repetições foram analisadas em triplicatas.

Após o preparo de todo material, cada frasco foi preenchido com 10 mL do meio de incubação. O meio foi composto por 2,5 mL de solução tampão com concentração de 285 mmol dm^{-3} de KH_2PO_4 (Merck®) a pH 7,3; 2,5 mL de KNO_3 (Nuclear®) a 300 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 (Reagen®) a 0,6% (v/v) e 4 mL de água deionizada. Os frascos foram colocados em um dessecador de vidro e submetidos ao vácuo, com uma pressão negativa de 600 mm Hg por 3 minutos ininterruptos, com posterior reintrodução do ar. Em seguida, os frascos foram transferidos para incubação em banho-maria a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ (± 1), no escuro, durante 90 min. As amostras eram agitadas de 15 em 15 min.

Ao término do tempo de incubação, adicionou-se 1 mL de solução de sulfanilamida a 1% em HCl 3 mol dm⁻³ para interromper a reação. O nitrito produzido em função da presença da enzima RN foi determinado por uma alíquota de 0,5 mL do meio de incubação, sendo que, para algumas amostras foi necessário usar uma alíquota de 0,25 mL do extrato, pois as leituras excederam o limite confiável de leitura do espectrofotômetro. A alíquota foi acrescentada a 0,5 mL de solução composta por sulfanilamida (Vetec[®]) 10 g dm⁻³ em HCl 3 mol dm⁻³ (Merck[®]) e 0,5 mL de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,2 g dm⁻³ (Sigma[®]). A solução foi homogeneizada e após 20 minutos, diluída a 4 mL com água deionizada, e a absorbância (540 nm) foi medida em espectrofotômetro modelo Spectronic 20D.

Para calcular a quantidade de nitrito contida nas amostras, fez-se uma curva padrão de nitrito como descrito no Capítulo 2. A curva padrão obtida definiu a equação: $\hat{y} = 0,0164 + 0,0551x$, por meio da qual foram determinadas as concentrações de nitrito (NO₂⁻) na solução. A aRN foi calculada com base nesta equação, e foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO₂⁻.

Determinação de nitrogênio na parte aérea (N%)

A análise para determinação do teor de nitrogênio total na parte aérea foi realizada pelo método Kjeldahl descrito em Embrapa (2009). Ressalta-se que, para determinar o teor de N, não se contabilizou a folha do tipo 0, utilizada de forma destrutiva para a análise da aRN, com isso, as estimativas, tanto de acúmulo de N como também de massa seca da parte aérea (MSPA), estão sub-estimadas.

Análises estatísticas dos dados

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos a análise para a verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Sisvar. Ao passo que a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Cochran ($p > 0,05$) no programa estatístico Saeg. Os dados em que não verificou-se a normalidade e homogeneidade foram submetidos às devidas transformações. Em seguida procedeu-se à análise de variância pelo teste F. Quando significativo, aplicou-se a análise de regressão, usando o programa estatístico Sisvar.

3.2.2 Experimento 2: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita

O experimento foi conduzido em casa de vegetação entre os meses de janeiro e março de 2012. Os tratamentos consistiram de oito datas de avaliação da aRN, após a aplicação de solução de uréia na superfície do solo aos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento, perfazendo um total de 24 parcelas. Cada parcela foi composta por uma planta de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000. Esta cultivar, também apresenta boa adaptabilidade ao sistema de “colheita mecânica crua”, e é promissora para o futuro da agricultura canavieira, mas, o ideal seria ter testado o mesmo genótipo avaliado no experimento 1, mas não foi possível devido à falta de material propagativo no momento da produção das mudas. As plantas foram crescidas em vaso com 4 dm³ de mistura de areia (granulometria fina) e vermiculita comercial de textura média, na proporção de 2:1 (v/v), respectivamente. O cultivo em areia e vermiculita teve a intenção de promover um ambiente onde a atuação dos fatores naturais, como microbiota e enzimas do solo fosse mínima, o que reduziria sua ação sobre a uréia.

As mudas utilizadas foram produzidas, no período compreendido entre dezembro de 2011 e janeiro de 2012, a partir de mini-toletes (5 cm de comprimento) oriundos da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Jaú (APTA Polo Centro Oeste), sendo germinados em copos de 0,5 dm³ preenchidos com areia de granulometria fina. Após 35 dias da germinação, estando as plantas com 6 cm de altura (da base até a inserção da folha +1), as mudas consideradas uniformes foram transplantadas para os vasos definitivos. Uma amostra da mistura de areia mais vermiculita, foi esfarelada, peneirada em malha 2 mm e enviada ao Departamento de Solos e Adubos da FCAV/UNESP para análise química. A amostra apresentou as propriedades químicas mostradas anteriormente na Tabela 1B.

Para a correção da fertilidade, baseou-se nas indicações de Raij e Cantarella (1997). Foi necessária a incorporação de o equivalente a 90 e 50 mg dm⁻³ de P₂O₅ e K₂O, que foi fornecida na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio

respectivamente. Ressalta-se que o nitrogênio só foi aplicado posteriormente, após a primeira coleta (tratamento Dia 0), e que o K_2O foi parcelado 2/3 no plantio (50 mg dm^{-3}) e 1/3 na forma de solução aplicada via substrato (25 mg dm^{-3}).

Após o transplante, objetivando fornecer alguns macros e micronutrientes às plantas, semanalmente fazia-se a aplicação via substrato de solução contendo pequena quantidade de S, Mg, Ca, Fe, Zn, B, Mn, Cu e Mo conforme Hoagland e Arnon (1950). Aos 30 dias, aplicou-se sobre o substrato o restante da dose de K na forma de solução de KCl (25 mg dm^{-3} de K_2O).

Após 55 dias do transplante para os vasos definitivos, as plantas apresentavam-se cloróticas, o que sugeria deficiência de nitrogênio (Figura 2). Foi feita, então, a aplicação de solução de uréia contendo o equivalente a 50 mg dm^{-3} de N nos vasos, com exceção das parcelas referentes ao tratamento Dia 0.

Os tratos culturais (irrigação e controle de pragas), assim como as atividades de coleta e preparo das amostras, além das determinações analíticas e procedimentos estatísticos foram semelhantes ao descrito para o experimento 1. Ressalta-se que a idade das plantas (desde a emergência) era de 90 dias e que, as diferenças de idade entre as plantas dos três experimentos (1, 2 e 3) foram principalmente devido ao tempo para que as plantas começassem a apresentar sintomas de deficiência de nitrogênio em virtude do esgotamento de cada tipo de substrato, e, ao tempo levado para a produção das mudas, uma vez que mudas produzidas em períodos mais frios demoraram mais tempo para crescer até um tamanho ideal para o transplante.



Figura 2. Momento da aplicação de solução de uréia em planta de cana-de-açúcar

3.2.3 Experimento 3: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por amostra de solo, areia e vermiculita

O experimento foi conduzido em casa de vegetação entre os meses de agosto e dezembro de 2012. Os tratamentos consistiram de cinco datas de avaliação: aos 0, 5, 10, 15 e 20 dias após a aplicação de diferentes fontes de fertilizantes nitrogenados (uréia, nitrato de amônio e sulfato de amônio), todas na dose de 50 mg dm^{-3} de N.

No momento das análises estatísticas, o experimento foi dividido em sub-experimentos individualizados, com finalidade de observar e comparar as respostas das diferentes fontes de adubo nitrogenado no tempo. Cada sub-experimento foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento, perfazendo um total de 15 parcelas cada. A parcela foi composta por uma planta de cana-de-açúcar, da cultivar IACSP93-3046, crescida em vaso com 4 dm^3 de mistura de areia de granulometria fina, vermiculita comercial de textura média e amostra de solo proveniente de um Latossolo vermelho de textura argilosa, na proporção de 2:1:1 (v/v), respectivamente. A terra empregada em 25% da composição do substrato utilizado neste experimento teve a finalidade de servir de inóculo natural de microrganismos, pois as transformações do nitrogênio, presente nos fertilizantes, à formas passíveis de absorção pelas plantas necessitam de ação microbiana e/ou catálise por enzimas do solo (CANTARELLA, 2007; OKUMURA; MARIANO, 2012). As propriedades químicas do substrato utilizado estão apresentadas na Tabela 1C, mostrada anteriormente. A correção da fertilidade foi feita de forma semelhante ao descrito para o experimento 2.

As mudas foram produzidas de junho a agosto de 2012, nas mesmas condições descritas para o experimento 1, porém apresentavam 58 dias de idade e apresentava altura de 7 cm (da base até a inserção da folha +1). Após 81 dias do transplante para os vasos definitivos, as plantas apresentavam-se cloróticas, sugerindo deficiência de nitrogênio. Foi feita então, a aplicação via substrato, de soluções de uréia ou nitrato de amônio ou sulfato de amônio (fontes de N mais comuns na agricultura brasileira), com exceção das parcelas referentes ao tratamento Dia 0 e do sub-experimento para controle sem adubação nitrogenada.

A irrigação, a aplicação de solução nutritiva e controle de lagartas, assim como as atividades de coleta (realizada quando as plantas estavam com 151 dias após a germinação) e preparo das amostras, além das determinações analíticas e procedimentos estatísticos foram semelhantes ao descrito para o experimento 2. O controle de infestações de ácaro foi realizado com acaricida comercial na dosagem recomenda na bula do produto.

3.3 Resultados e Discussão

Com a finalidade apenas de entender as respostas das plantas aos diferentes substratos utilizados nos três experimentos, compararam-se as grandezas dos valores médios gerais de cada variável (Tabela 2). A priori, estas comparações não foram testadas estaticamente. Os resultados estatísticos, alvos do estudo, estão descritos mais abaixo, separadamente, para cada experimento. Lembrando que, no experimento 3 a média geral foi obtida apenas com os dados do sub-experimento adubado com uréia (fonte comum em todos os experimento).

Então, como resultados da pesquisa, primeiramente, as comparações visuais das médias gerais mostraram que, para a variável aRN as plantas do experimento 1 (cultivadas em substrato composto por amostra de solo) apresentaram maior média ($1,10 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^-) enquanto, nos demais experimentos, a expressão da enzima foi em torno de 30% menor (Tabela 2). Esta maior atividade observada nas plantas do experimento 1, pode ter sido devido a maior luminosidade e temperaturas observadas no mês de outubro (coleta). A luz induz o aumento da síntese da enzima, tendo como consequência o aumento na aRN (LILLO, 2008), assim como, a temperatura induz alterações na transcrição da enzima (FRESCHI et al., 2009). Em estudo com plantas de *Camellia sinensis* sob climas contrastantes na Índia, Venkatesan e Ganapathy (2004) observaram maiores aRN nas plantas cultivadas em local com maiores temperaturas.

Também para efeito de comparação apenas, verificou-se que as médias gerais da altura e da MSPA foram as menores no experimento 2 (areia e vermiculita) (Tabela 2), o que pode estar ligado as diferenças entre genótipos, uma vez que a cultivar usada nos outros experimentos era diferente, ou ainda, devido a idade das

plantas, uma vez que estas plantas eram as mais novas em relação às outras (aproximadamente 60 dias de diferença), além de terem sido coletadas no mês de março de 2012, época com menores temperaturas, luminosidade e fotoperíodo na região. Almeida et al. (2008) descrevem que, a temperatura do ar é um elemento climático que afeta o crescimento da cana-de-açúcar, e ainda que, a faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento vegetativo da cultura é de 25 a 33 °C.

Quanto ao teor de N, a maior média foi notada no experimento 1 (Tabela 2) (12,42 mg kg⁻¹). Ido et al. (2006) discutiram que um substrato que apresenta menor velocidade de drenagem (mais argiloso) pode proporcionar à cultura da cana-de-açúcar melhor aproveitamento da água, bem como, aumentar a eficiência de aproveitamento de nutrientes, principalmente nitrogênio.

O acúmulo de N nas plantas do experimento 2 foi o menor (33,84 mg planta⁻¹) (Tabela 2). Isto indica que menos nitrogênio pode ter sido disponibilizado da uréia, uma vez que, neste substrato (areia e vermiculita), provavelmente as quantidades de urease (enzima que degrada a uréia) são menores do que em solo, pois a urease é produzida por microrganismos (OKUMURA; MARIANO, 2012). O segundo menor acúmulo (43,48 mg planta⁻¹) foi observado no experimento 3 (areia + vermiculita + terra), possivelmente, devido a presença de 1/3 de solo natural neste substrato (um pouco mais de urease). Já no cultivo usando apenas amostra de solo como substrato, foi observado um acúmulo (82,64 mg planta⁻¹), que correspondeu a mais que o dobro dos acúmulos observados nos outros experimentos (Tabela 2), o que pode ter sido devido a maior quantidade de urease.

Somado a isto, pode ser que, na fase avaliada no estudo, as plantas do experimento 2 não estivessem em um período de maior exigência a N, pois apresentavam idade menor que as dos experimentos 1 e 3. Segundo Almeida et al. (2008), o crescimento de plantas de cana-de-açúcar em condições de campo acompanha uma curva do tipo sigmoide, onde na primeira fase (até os 90 dias do plantio) quase não crescem. Em compensação ocorre um significativo aumento da biomassa de raiz nesta fase. Depois nota-se crescimento acentuado da parte aérea até os 180 dias do plantio e por fim a estabilização até a colheita.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as variáveis analisadas nos experimentos 1, 2 e 3

TRATAMENTOS	aRN	Altura	MSPA	MSSR	Teor de N	Acúmulo de N
Experimento 1: Cultivar IACSP93-3046 cultivada em substrato natural (Amostra de solo)						
Tempo (F)	24,64***	47,09***	40,09***	9,98***	5,44**	16,54***
Média geral	1,10	25,40	7,03	9,47	12,42	82,64
C.V. (%)	15,00	4,84	16,34	12,16	10,95	17,70
Experimento 2: Cultivar IACSP95-5000 cultivada em substrato areia + vermiculita						
Tempo (F)	4,51**	45,49***	16,41***	0,34 ^{ns}	20,86***	30,77***
Média geral	0,70	17,40	3,21	7,09	10,31	33,84
C.V. (%)	20,81	4,78	10,05	6,44	10,16	11,99
Experimento 3: Cultivar IACSP93-3046 cultivada em substrato amostra de solo + areia + vermiculita						
Sub-experimento controle (sem N)						
Tempo (F)	6,63**	1,68 ^{ns}	5,41*	0,29 ^{ns}	4,98*	0,85 ^{ns}
Média geral	0,18	15,60	4,06	6,64	3,74	15,02
C.V. (%)	7,08	3,40	9,95	16,03	6,54	11,77
Sub-experimento fonte uréia						
Tempo (F)	323,78***	56,28***	39,85**	1,57 ^{ns}	85,32***	159,51***
Média geral	0,65	20,50	4,96	7,17	8,14	43,48
C.V. (%)	6,47	6,04	8,33	13,15	6,40	8,11
Sub-experimento fonte nitrato de amônio						
Tempo (F)	44,02***	84,85***	22,87**	0,547 ^{ns}	109,24***	65,99***
Média geral	0,82	19,80	4,72	7,14	8,01	40,32
C.V. (%)	16,47	4,56	9,02	17,51	5,82	11,89
Sub-experimento fonte sulfato de amônio						
Tempo (F)	31,74***	24,14***	14,37**	1,07 ^{ns}	34,67***	132,00**
Média geral	0,76	19,5	4,64	7,15	7,69	37,87
C.V. (%)	19,48	7,92	13,92	14,90	9,16	8,60

^{ns}, ***, **, * = não significativo, significativo aos níveis de 0,1; 1 e 5 de probabilidade, respectivamente

3.3.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostra de solo)

Observou-se um incremento, com ajuste quadrático da aRN, os quais atingiram o valor de $1,57 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- aos 14 dias. No momento da aplicação do N a aRN estimada foi de $0,92 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- e aos 32 dias foi observado a menor atividade (Figura 3).

Para cana-de-açúcar, não foi encontrado resultados que permitam a comparação das flutuações da aRN em curto prazo após a adubação. Em estimativas em longo prazo (60 a 180 dias após a aplicação de uréia), notam-se, de forma geral, maiores atividades nas primeiras épocas da estimativa e decréscimo no final do período experimental (SILVA, 1989; SILVEIRA; CROCOMO, 1990; VIEIRA; TRIVELIN; MEGDA, 2010).

Em plantas de mostarda indiana, Ahmad et al. (2003) observaram maiores atividades da RN aos 15 dias após a adubação nitrogenada que ocorreu no momento da semeadura, sendo que, a aRN decresceu até quase zero aos 120 dias, porém, não objetivaram proceder a estimativa antes dos 15 dias após a adubação, portanto, a comparação com estes resultados servem apenas para reafirmar que a aRN pode flutuar, não só com o passar do tempo após a adubação mas também com a idade da planta.

Venkatesan e Ganapathy (2004) observaram aRN máxima aos 7 dias após a adubação de plantas de chá na Índia, indicando que a eficiência do uso do fertilizante pelas plantas é maior neste período. Entretanto, até os 28 dias ainda era alta a aRN, decaindo até um ponto de mínima aos 35 dias. Os resultados revelaram que nessas plantas, o intervalo entre cada aplicação do fertilizante não deve ultrapassar 28 dias. Em estudo com plantas de café adubadas com uréia, a maior atividade da RN foi observada aos 20 dias após a aplicação do nitrogênio, independente da dose do nutriente (NETO et al., 2011), porém o decréscimo após este período foi atribuído a queda de temperatura e redução da precipitação, o que parece não terem sido as causas no presente estudo.

A redução da atividade da RN após os 14 dias pode estar associada ao fato que, as plantas estavam deficientes em nitrogênio no momento da aplicação. Com isso, ao se adicionar o fertilizante, este foi intensamente absorvido para suprir as demandas em N das plantas, e pode ser que aos 14 dias as necessidades tenham sido atendidas, havendo a redução da absorção de nitrato, e consequentemente, a redução da atividade, pois o nitrato absorvido até então, pode ter sido incorporado aos esqueletos de carbono e ter formado aminoácidos, que foram remobilizados para a folha em expansão (folha do tipo 0), e sabe-se que, altas concentrações dessas moléculas reduzem a atividade da RN (CRAWFORD et al., 2000). Contudo, as plantas podem ter continuado a absorver nitrogênio na forma de amônio, o que também inibiria a atividade da enzima (VAUCHERET; CABOCHE, 1995). Esta hipótese é reforçada pelas observações de aumento linear no acúmulo de N total na parte aérea (Figura 7). Além disso, limitação por perda do adubo, parece não ter ocorrido, pois, é conhecido que a volatilização do nitrogênio da uréia acontece aos 2 a 3 dias após a aplicação (CANTARELLA, 2007), tempo este que coincidiu com o dobro do acúmulo de N na parte aérea (Figura 7), e também da aRN.

Além do mais, é conhecido que a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio diminui durante a senescência da planta. Em geral, a atividade da redutase do nitrato é perdida primeira, enquanto que a glutamina sintetase (GS), a glutamato sintase (GOGAT) e a Glutamato desidrogenase (GDH) permanecem ativas por um período mais longo (SOUZA; FERNANDES, 2006).

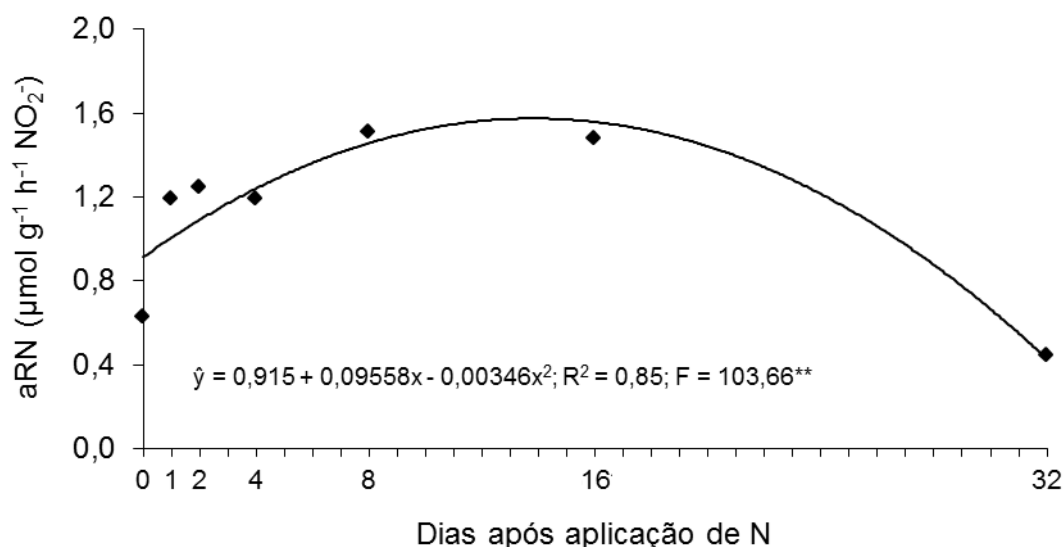


Figura 3. Atividade da redutase do nitrato nas folhas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

Observou-se um incremento linear da altura ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, a altura foi de 22,22 cm e à medida que se passaram os dias, a altura aumentou, até 33,51 cm aos 32 dias (Figura 4).

Tanto para as variáveis MSPA como para MSSR, observaram-se incrementos lineares da massa seca ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, as massas secas de parte aérea e de sistema radicular foram de 4,24 e 8,10 g planta⁻¹. À medida que se passaram os dias, aumentaram até 14,15 e 13 g planta⁻¹ aos 32 dias, respectivamente (Figura 5). Ressalta-se que, a massa seca de toletes, no momento da coleta, não apresentou diferença significativa pelo teste F (média 7,03 g, $F = 1,30^{ns}$, $CV = 14,67\%$), por isso, foi incluída nas pesagens para determinar a MSSR. Nota-se, de forma geral, que os dados médios das variáveis produtivas foram muito semelhantes na fase inicial (até os 8 dias), o que é comum em avaliações a curto prazo (ROBINSON et al., 2011).

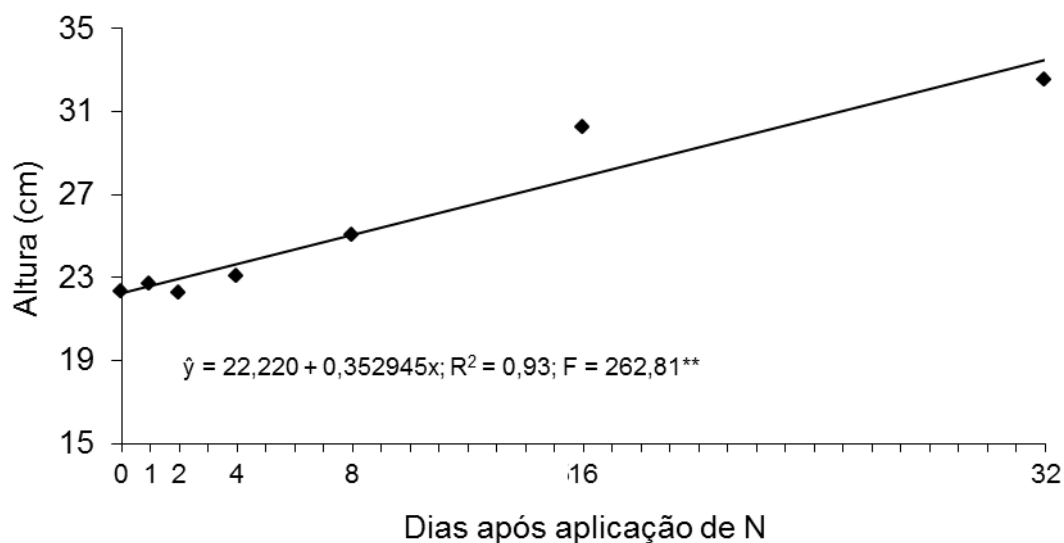


Figura 4. Altura das plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

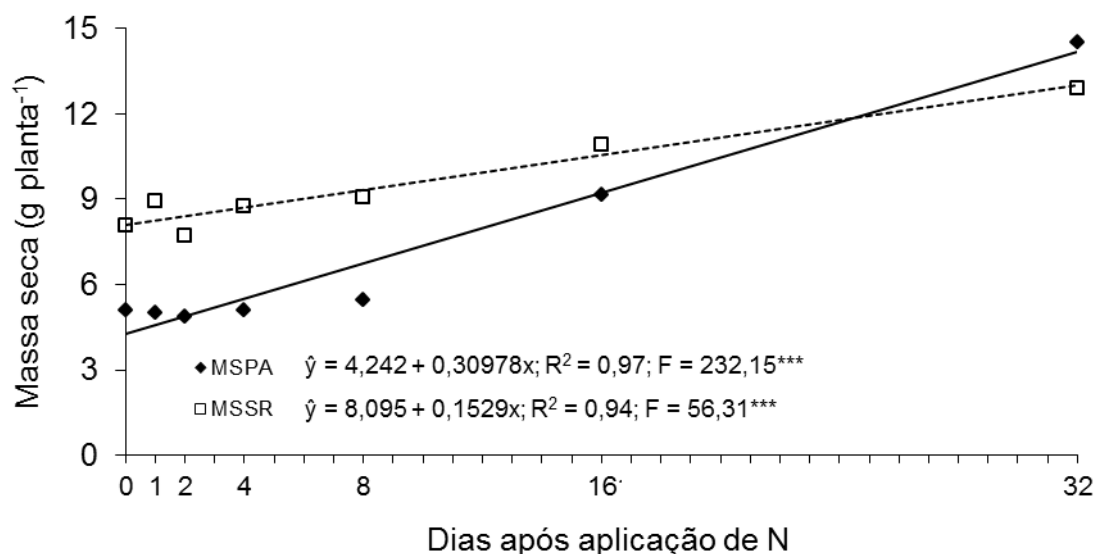


Figura 5. Massa seca da parte aérea (MSPA) e sistema radicular (MSSR) de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Ao analisar estatisticamente todo o conjunto de dados dos teores de nitrogênio da parte aérea, notou-se que, a partir do dia 6 após a adubação, houve redução com ajuste quadrático. No 6º dia, o teor foi o mais alto (13,08 g kg⁻¹). No dia

da aplicação de N, o teor foi de $12,88 \text{ g kg}^{-1}$, contudo este modelo não foi representativo para o conjunto integral de dados ($R^2 = 0,7$), mas parece representar o comportamento dos dados obtidos com os dias 8, 16 e 32 (Figura 6). É possível que tenha ocorrido efeito de diluição do nutriente, uma vez que a planta incorporou muita biomassa neste período (Figura 5). Neto et al. (2011) observaram em plantas de café que o teor de N foliar aumentou até os 49 dias após a adubação com 200 kg ha^{-1} de N, depois deste período ocorreu também a redução dos teores. Porém, atribuíram a queda, à realocação do nutriente para as raízes, mas no presente trabalho, parece que não foi o caso, pois o acúmulo de N na biomassa de parte aérea não diminuiu (Figura 7).

Por outro lado, analisando somente os dados de teores de N obtidos no período inicial (0 aos 4 dias), notou-se tendência a um incremento linear, porém a significância estatística foi acima de 10% de probabilidade ($p=0,12$). Contudo, os dados se ajustaram a equação $\hat{y} = 11,925 + 0,6449x$ com um R^2 de 0,95 (F do modelo = 6,77*) ao decorrer dos dias, porém, novamente, ressalta-se a ausência de significância estatística pelo teste F ($F = 2,38^{ns}$ com CV = 11,24%). Observando-se os novos resultados dos dados compreendidos entre os dias 0 e 4 (Figura 6), no momento da aplicação, o teor de N passou a ser de $11,93 \text{ g kg}^{-1}$, o que parece ser um valor mais próximo da realidade ($R^2 = 0,95$) e à medida que se passaram os dias, o teor de N aumentou até $14,51 \text{ g kg}^{-1}$ no quarto dia (Figura 6).

Observou-se um incremento linear do acúmulo de N na parte aérea ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, a biomassa de uma planta possuía $59,58 \text{ mg}$ de nitrogênio, e aumentou, até $141,57 \text{ mg planta}^{-1}$ aos 32 dias (Figura 7).

O aumento linear do teor de N na fase inicial pode ter sido observado pelo fato das plantas estarem deficientes em nitrogênio, no momento da adubação. Ao adicionar o fertilizante, este foi intensamente absorvido para suprir as demandas em N das plantas, e após estarem suficientemente nutridas, iniciou-se um processo de incorporação de biomassa que, pode ter diluído o teor de N. Portanto, o aumento linear no acúmulo de N total observado na parte aérea (Figura 7) pode ser atribuído ao maior aumento da biomassa seca (Figura 5). Robinson et al. (2011) notaram que, em 24 horas da aplicação de N, ocorreu o efeito no aumento de teores de espécies

de N em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições controladas, onde notaram maiores proporções de amônio a nitrato acumulado na biomassa. Porém 24, horas não foi um tempo suficiente para que observassem aumentos na matéria seca.

A cada dia, cada planta absorveu 2,06 mg de N, somando um total de 142 mg acumulado aos 32 dias (Figura 7), sendo que, no momento da adubação, cada planta recebeu 200 mg de N na forma de uréia, ou seja, 71% do N aplicado foi recuperado. Geralmente, o aproveitamento de N tende ser menor (CANTARELLA, 2007) por isso, é possível que o solo ou as reservas do tolete tenham contribuído para a nutrição nitrogenada das plantas (BASTO; CAZETTA; PRADO, 2010). Em contrapartida, pode ser um indicativo da possível fixação biológica de N, uma vez que plantas de cana-de-açúcar estabelecem associações com diversas espécies de bactérias diazotróficas (BODDEY et al., 2003).

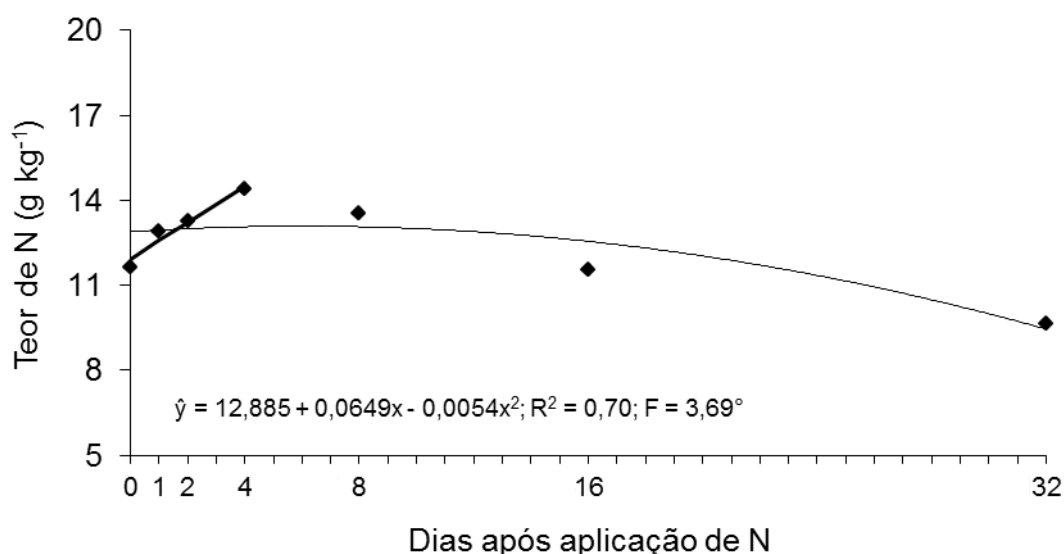


Figura 6. Teor de nitrogênio total na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

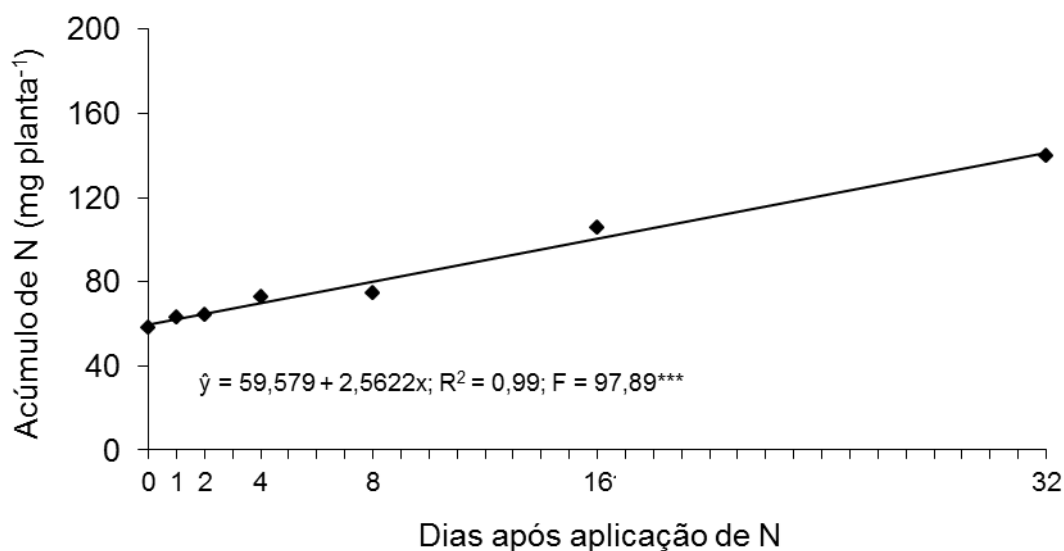


Figura 7. Acúmulo de nitrogênio total na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

3.3.2 Experimento 2: Avaliações de plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita

Observou-se um incremento, com ajuste quadrático da aRN, os quais atingiram o valor de $0,87 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- aos 12 dias. No momento da aplicação do N a aRN estimada foi de $0,37 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- (Figura 8). Estes resultados, apesar do experimento ter sido realizado em areia e vermiculita, foram bem parecidos com os resultados do experimento 1, com substrato composto por amostra de solo. Assim sendo, as comparações de resultados e justificativas são as mesmas das do experimento 1.

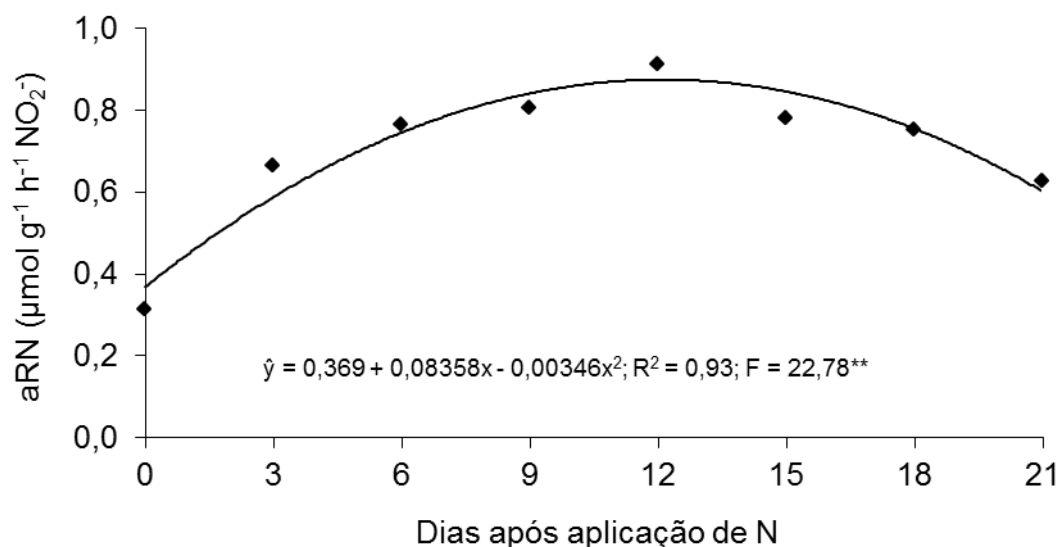


Figura 8. Atividade da redutase do nitrato nas folhas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000 em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

Houve um incremento linear da altura ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, a altura foi de 12,91 cm e, à medida que se passaram os dias, a altura aumentou, até 21,88 cm aos 21 dias (Figura 9).

A massa seca de parte aérea aumentou de forma linear ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, a massa seca foi de 2,16 g planta⁻¹. À medida que se passaram os dias, aumentaram até 4,25 g planta⁻¹ aos 21 dias (Figura 10). A MSSR não foi alterada em função do número de dias após a aplicação de nitrogênio, apresentando valor médio de 7,09 g planta⁻¹ (Figura 10). A massa seca de toletes, no momento da coleta também não diferiu pelo teste F (média 5,71 g F = 0,48^{ns}, CV = 9,97%). A ausência de acúmulo de biomassa de raiz, ao decorrer dos dias, pode estar associada à deficiência de nitrogênio antes da adubação, pois, com o intuito de aumentar a área de exploração, as plantas podem ter aumentado a produção de raízes laterais no período de escassez de N (SILVA; DELATORRE, 2009). E, assim que o nutriente foi disponibilizado, via adubação, as raízes pararam de crescer.

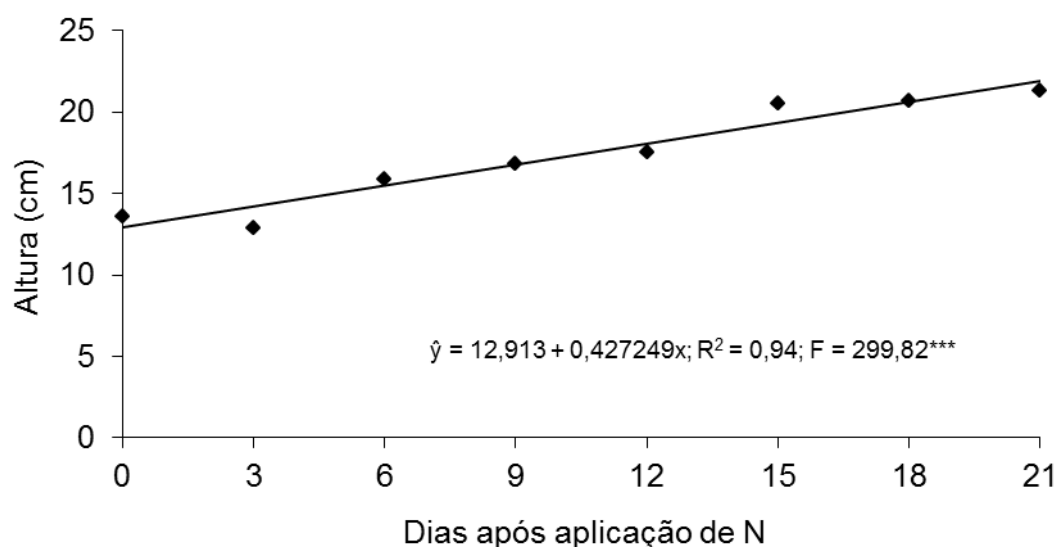


Figura 9. Altura das plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

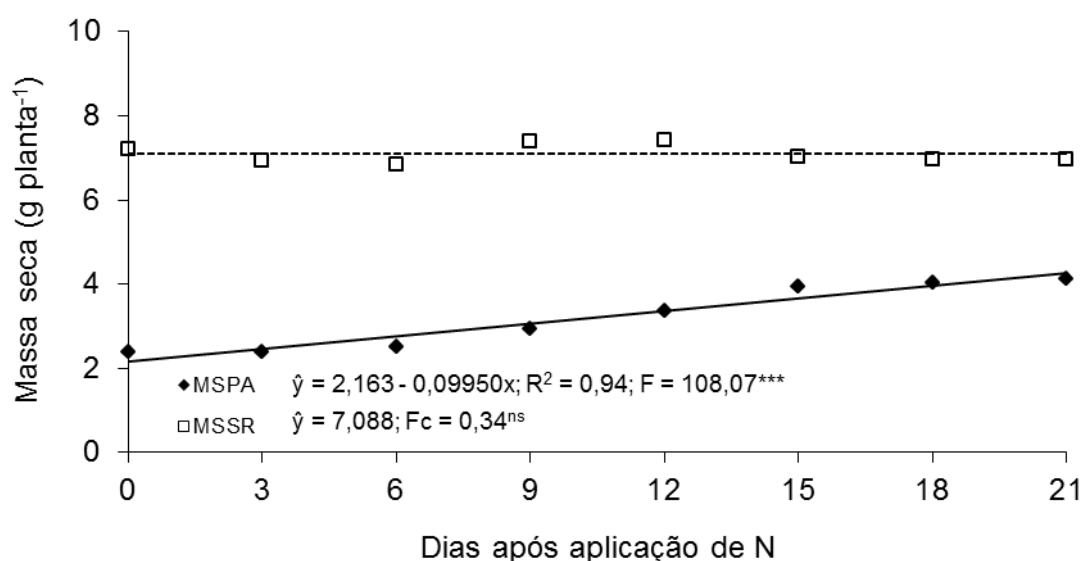


Figura 10. Massa seca da parte aérea (MSPA) e sistema radicular (MSSR) de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade; ^{ns} = não significativo

No momento da aplicação do N, o teor do nutriente observado na matéria seca de parte aérea das plantas foi de 4,96 g kg⁻¹ (Figura 11). Com a adubação nitrogenada, notou-se um aumento, com ajuste quadrático nos teores, os quais

atingiram o valor de $12,86 \text{ g kg}^{-1}$ aos 13 dias. De modo geral, o maior teor de N, por pouco, coincidiu com a maior aRN observada aos 12 dias da adubação. O comportamento do teor de N depois da aplicação de N foi bem parecido com o da variável atividade da RN (Figura 8), sugerindo uma relação linear positiva entre estas duas variáveis. O que é possível, devido provavelmente, no período inicial, às plantas terem absorvido o N na forma de nitrato, e este íon ser o substrato da enzima RN, enzima esta, que controla o nível de assimilação de N (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012). Reis, Furlani Junior e Haga (2007) observaram em plantas de café, forte correlação positiva entre estas duas variáveis, sugerindo que tanto o teor de N, como a atividade da enzima pode servir de indicadores nutricionais, em nitrogênio, para a cultura.

Para o acúmulo de N, observou-se um incremento quadrático do N na parte aérea ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, a biomassa de uma planta possuía $9,33 \text{ mg}$ de nitrogênio, e a medida que se passaram os dias, aumentou, até $44,80 \text{ mg planta}^{-1}$ no 17º dia (Figura 12).

O decréscimo do acúmulo de N, observado a partir do 13º dia da adubação, pode estar associado à diminuição do teor foliar, uma vez que, a biomassa da parte aérea incrementou de forma linear com as doses e, os teores foliares tenham diminuído em função de limitações, por parte da fonte uréia, pois notou-se que as plantas absorveram no 17º dia em torno de $43,5 \text{ mg planta}^{-1}$ de N, sendo que foram aplicados 280 mg . Portanto, é possível que o adubo não tenha sido disponibilizado em sua totalidade para as plantas, uma vez que o substrato foi composto por areia e vermiculita, que poderia conter populações reduzidas de microrganismos responsáveis pela produção de uréase, enzima esta, que catalisa a hidrólise deste adubo (OKUMURA; MARIANO, 2012). Ou ainda que, as plantas não estivessem em um período de alta absorção, pois, comparado ao estudo de Almeida et al. (2008), 90 dias, que era a idade das plantas do presente experimento, ainda não é a fase de maior absorção por plantas de cana-de-açúcar, e a quantidade que foi absorvida, até o 17º dia, tenha sido suficiente para nutrir as plantas até então.

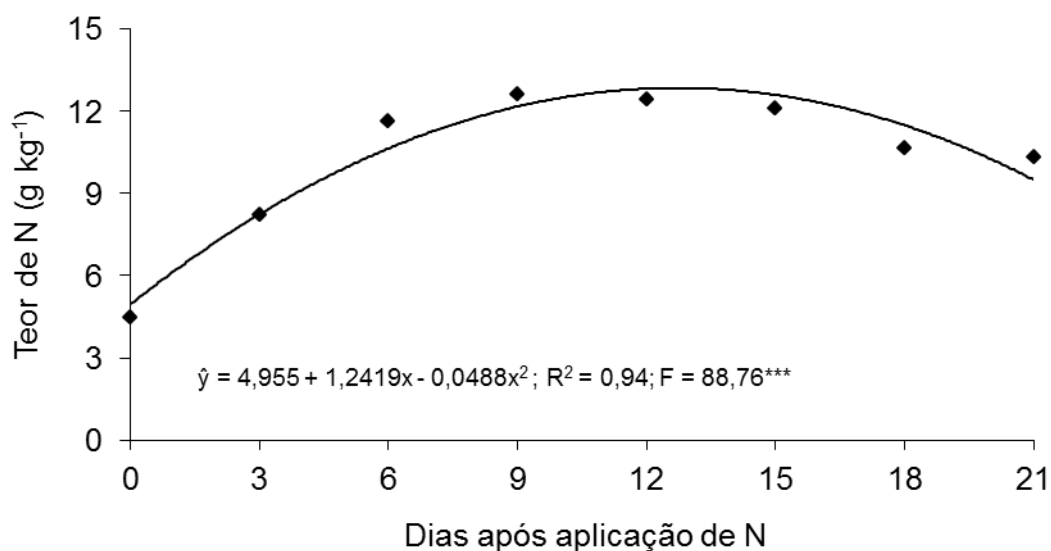


Figura 11. Teor de nitrogênio total na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

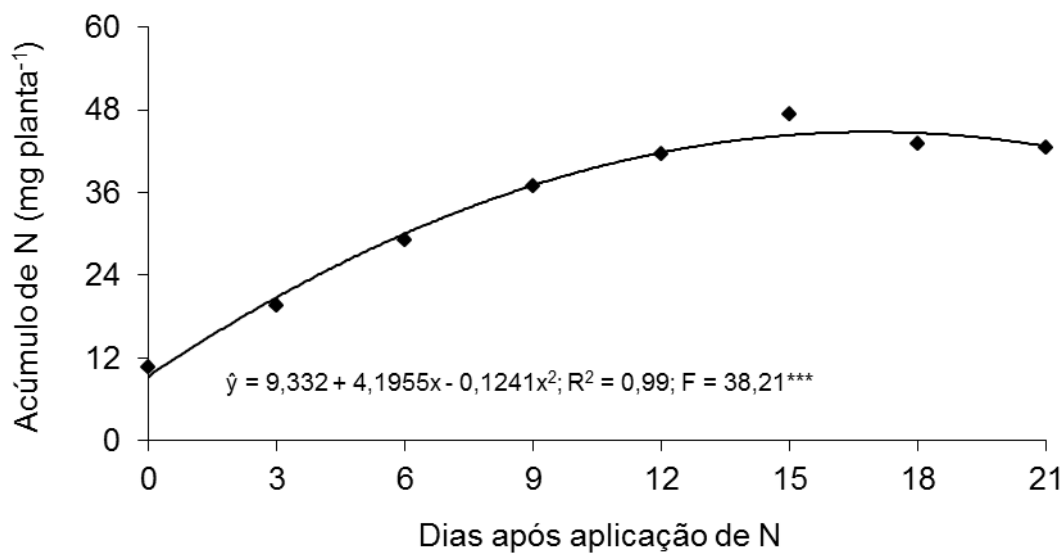


Figura 12. Acúmulo de nitrogênio total na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função do tempo após a aplicação de solução de uréia na superfície do substrato. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

3.3.3 Experimento 3: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por amostra de solo, areia e vermiculita

Nos experimentos 1 e 2 (Figuras 3 e 8), após 14 e 12 dias da adubação, respectivamente, se iniciou o decréscimo da aRN, o que não foi observado no experimento 3 cuja atividade continuou sendo incrementada de forma linear, independente da fonte usada (Figura 13).

Isto pode ter acontecido porque as plantas do experimento 3 estavam com 151 dias de idade, portanto, mais velhas que as dos experimentos 1 e 2. Com esta idade, se estivessem sendo cultivadas no campo, estariam em fase de desenvolvimento acelerado (ALMEIDA et al., 2008), apresentando alta demanda por N como consequência. Além disso, as plantas poderiam estar com uma maior deficiência em N no momento em que receberam as fontes nitrogenadas, com isso mais necessitadas do nutriente. Esta inferência é feita baseada na média do teor de N na parte aérea do experimento 3, que foi a menor (Tabela 2).

No sub-experimento controle, os resultados estatísticos revelaram diferença significativa entre os tratamentos sobre a aRN (Tabela 2), onde apontaram o melhor modelo como sendo o linear. Contudo, o R^2 da equação foi muito baixo (0,38), e esta diferença não ficou muito clara no diagrama de dispersão (Figura 13), portanto, preferiu-se considerar a não existência de diferença significativa. O número de dias após a aplicação de nitrogênio, não influenciou a aRN, sendo que o valor médio observado foi de $0,20 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- . Venkatesan e Ganapathy (2004) observaram que nas folhas de chá, no tratamento controle, a aRN também não foi alterada até os 35 dias da adubação das plantas.

Nos sub-experimentos com uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio, observou-se aumento linear da aRN ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, a aRN foi de 0,12; 0,19 e 0,18 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- , respectivamente. À medida que se passaram os dias, a aRN aumentou para as três fontes até 1,19; 1,25 e 1,47 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- , aos 20 dias (Figura 13).

Até os 20 dias, não se observou queda nas estimativas, o que coincidiu com a última análise da aRN. Certamente, a queda seria observada fora da região experimental.

Pelos resultados obtidos nos experimentos anteriores, esse comportamento não era esperado, não sendo possível corrigir esta falha, pela falta de plantas suficientes para analisar após os 20 dias, portanto, não foi possível identificar o momento em que a atividade da RN começaria a decair. Mas, nesta fase inicial, a fonte nitrato de amônio foi a que tendeu a promover maiores aRN. Resultados semelhantes foram observados por Vieira, Trivelin e Megda (2010) estudando cana-de-açúcar, porém, aos 60, 120 e 180 dias após a adubação, sendo que não objetivaram avaliar as plantas em tempos mais próximos da adubação.

A fonte nitrato de amônio (NH_4NO_3) apresenta em sua composição a metade do N na forma de nitrato e a outra na forma de amônio tendo em vista que, grande parte do N seria absorvida diretamente na forma de nitrato, nos períodos iniciais após a adubação, que por ser o substrato da enzima RN, induz o aumento da atividade (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012).

Já, o sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, apresentou comportamento mediano entre as fontes nitrato de amônio e uréia. Ao ser adicionado no solo, o fertilizante é hidrolisado em NH_4^+ e SO_4^{2-} , sendo que, num primeiro momento o íon amônio reage com o complexo de troca de cátions, ficando adsorvido temporariamente nas superfícies das partículas de argila, com isso, sua mobilidade é reduzida e a absorção pela planta é limitada (LATIFA; ANGGARWULAN, 2009). Além disso, sabe-se que grande parte do amônio disponibilizado no solo é rapidamente imobilizado pela microbiota do solo (CANTARELLA, 2007), e ainda, que o amônio, é a fonte preferida pela cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011), porém o íon induz o decréscimo dos níveis da enzima (VAUCHERET, H.; CABOCHE, 1995), além de não ser o seu substrato.

Em planta arbórea *Juglans nigra*, após 60 dias da adubação com fontes de N observou-se maiores aRN com o uso da fonte nitrato de potássio em relação ao nitrato de amônio e sulfato de amônio, sendo que, a aRN foi menor com o uso de N na forma de amônio apenas (NICODEMUS; SALIFU; JACOBS, 2008). Carvalho et al. (2006), utilizaram estas mesmas fontes em plantas de *Vernonia herbacea* porém, aos 120 dias após a aplicação, obtiveram resultados semelhantes aos obtidos para a planta arbórea. Entretanto, mesmo em solos adubados com N amoniacal, em um espaço de tempo relativamente curto (15 a 30 dias), é possível que ocorra o

predomínio de nitrato pela oxidação promovida pela microbiota do solo (CANTARELLA, 2007).

Todavia, a eficiência dos fertilizantes nitrogenados comumente usados na agricultura é semelhante, pois são solúveis em água e têm o N prontamente disponível para os vegetais. No entanto, diferenças no comportamento podem ocorrer por causa de mecanismos de perdas, presença ou interação com outros nutrientes, ou ainda acidificação do solo (CANTARELLA, 2007).

A uréia foi a fonte que apresentou menor aumento da atividade da RN. Esta fonte é passível de perdas por volatilização da amônia no processo da hidrólise mediado pela enzima urease (OKUMURA; MARIANO, 2012). As maiores perdas são observadas de 2 a 3 dias após adubação (CANTARELLA, 2007). Em experimento com cana-de-açúcar, Costa, Vitti e Cantarella (2003) observaram que até os 8 dias da aplicação da uréia, a volatilização da amônia foi mais intensa que após este período. No estudo de Vieira, Trivelin e Megda (2010) com cana-de-açúcar, as fontes uréia e sulfato de amônio se diferenciam quanto à indução da atividade da RN apenas aos 180 dias após a adubação, sendo que a uréia foi inferior ao sulfato de amônio.

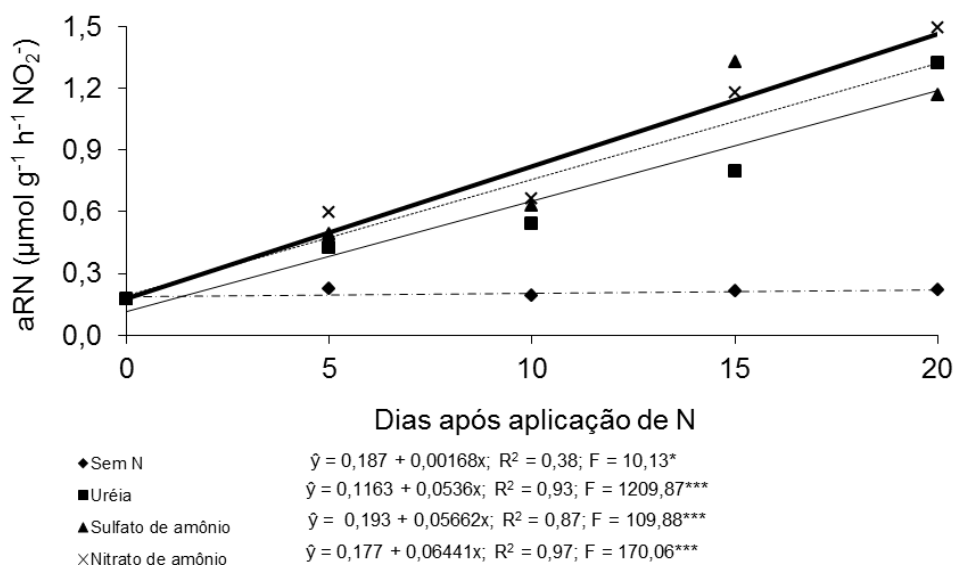


Figura 13. Atividade da redutase do nitrato nas folhas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação superficial de soluções de uréia, nitrato de amônio e sulfato de amônio. ***, * = significativo aos níveis de 0,1 e 5% de probabilidade, respectivamente

No sub-experimento controle, a altura das plantas não foi influenciada pelo número de dias após a aplicação de nitrogênio, apresentando valor médio de 15,63 cm. Isto ocorreu devido à escassez de N, que é o principal nutriente responsável pelo crescimento de cana-de-açúcar (VALE et al., 2009). Nos demais sub-experimentos observou-se aumentos lineares das alturas ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, as alturas foram de 13,87; 14,13 e 13,93 cm para a uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio, respectivamente. À medida que se passaram os dias, as alturas aumentaram, até 27,13; 24,87 e 25,72 cm aos 20 dias, respectivamente (Figura 14). Ou seja, as plantas que não receberam N, não cresceram, e as que receberam, independentemente da fonte cresceram, e isto, na ordem de 0,53 a 0,66 cm por dia até o 20º dia (Figura 14).

Em todos os sub-experimentos, observou-se aumentos lineares das MSPA ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, as MSPA foram de 3,43; 3,08; 2,91 e 3,25 g planta⁻¹ para o controle, uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio, respectivamente. À medida que se passaram os dias, as MSPA aumentaram até 4,69; 6,83; 6,36; 6,18 g planta⁻¹ aos 20 dias, respectivamente (Figura 15). De modo geral, as plantas que não receberam N apresentaram biomassa inferior às que receberam. O papel e importância do nitrogênio no desenvolvimento de plantas estão bem discutidos em várias publicações sobre nutrição mineral (MALAVOLTA, 2006; PRADO, 2008; HAWKESFORD et al., 2012).

Nos quatro sub-experimentos (controle, uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio) a MSSR não foi influenciada pelo número de dias após a aplicação de nitrogênio, apresentando valores médios de 3,43; 3,08; 2,91 e 3,25 g planta⁻¹, respectivamente (Figura 16). A massa seca de toletes foi igual estatisticamente para todos os sub experimentos, com valor médio geral de 4,26 g planta⁻¹ (dados não apresentados).

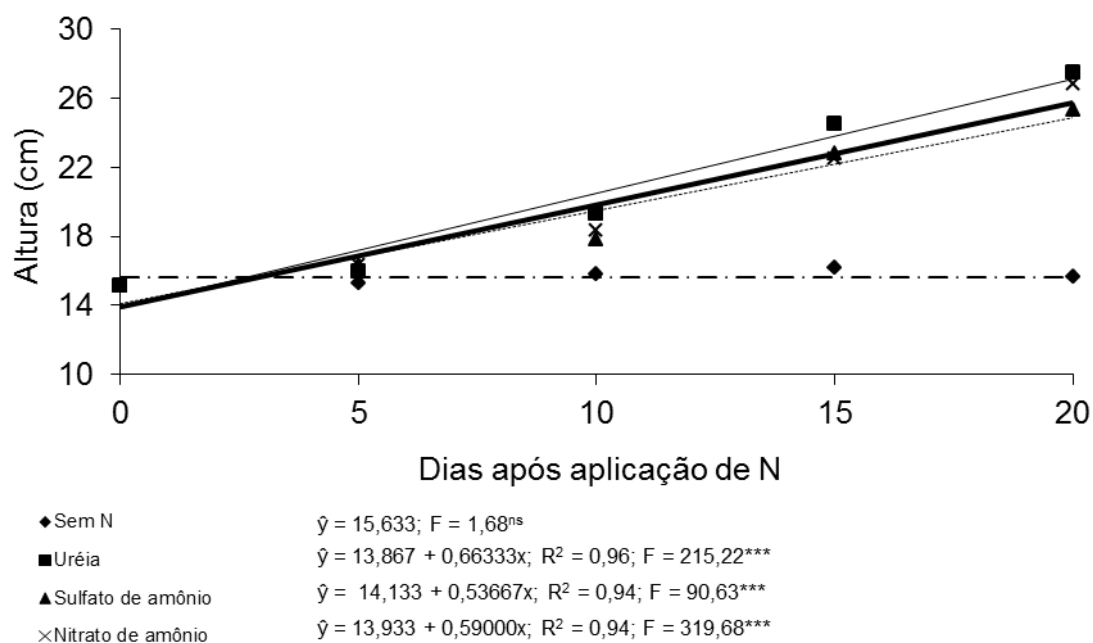


Figura 14. Altura de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação superficial de soluções de uréia, nitrato de amônio e sulfato de amônio. ^{ns}, *** = não significativo e significativo ao nível de 0,1% de probabilidade, respectivamente

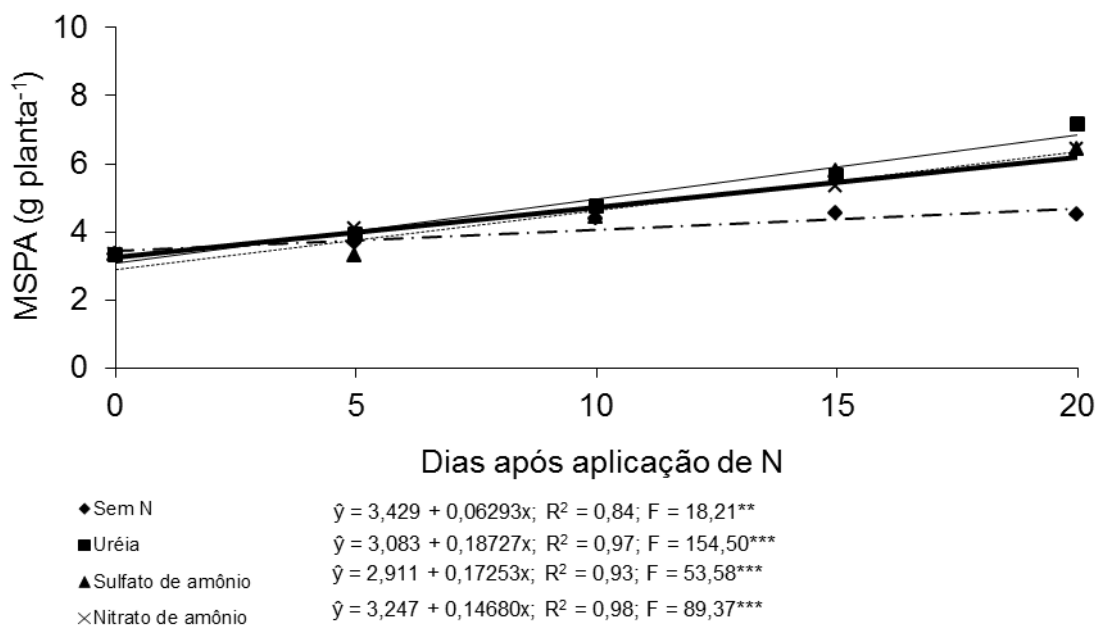


Figura 15. Massa seca da parte aérea (MSPA) de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação superficial de soluções de uréia, nitrato de amônio e sulfato de amônio. ***, ** = significativo aos níveis de 0,1 e 1% de probabilidade, respectivamente

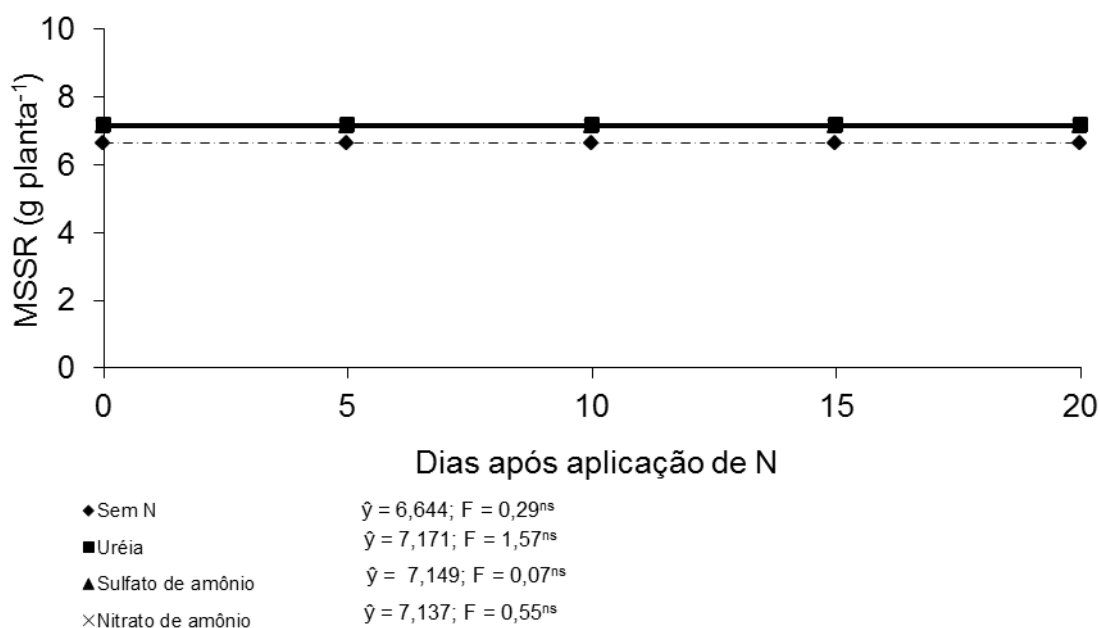


Figura 16. Massa seca do sistema radicular (MSRR) de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação superficial de soluções de uréia, nitrato de amônio e sulfato de amônio. ^{ns} = não significativo

No sub-experimento controle, observou-se o decréscimo linear do teor de N na parte aérea ao decorrer dos dias após a adubação com N. No momento da aplicação, o teor foi o mais alto ($4,10 \text{ g kg}^{-1}$). À medida que se passaram os dias, o teor diminuiu até $3,38 \text{ g kg}^{-1}$ aos 20 dias (Figura 17). O decréscimo pode ter ocorrido em virtude da mobilização de N para outros órgãos com o passar do tempo (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010), uma vez que o meio de cultivo não continha N.

No sub-experimento com a fonte sulfato de amônio, os dados de teor de N na parte aérea ao decorrer dos dias após a adubação com N, se ajustaram melhor ao modelo linear, porém crescente com as doses do adubo. No momento da aplicação, o teor foi de $4,72 \text{ g kg}^{-1}$. À medida que se passaram os dias, o teor aumentou até $10,66 \text{ g kg}^{-1}$ aos 20 dias (Figura 17). Nos demais sub-experimentos (uréia e sulfato de amônio), notou-se um aumento, com ajuste quadrático nos teores de nitrogênio na parte aérea, os quais atingiram os valores de $11,56$ e $12,76 \text{ g kg}^{-1}$ aos 27 e 35 dias após a adubação, respectivamente. No momento da aplicação do N, os teores observados foram de $4,16$ e $4,13 \text{ g kg}^{-1}$ (Figura 17).

Observou-se que, os pontos de máximas dos teores de N, com estas duas fontes, se deram fora da região experimental, portanto, seria interessante ter aumentado o tempo do experimento, entretanto, o experimento foi planejado para 20 dias e não se tinha parcelas suficientes para análises além deste tempo.

Como observado no presente estudo, Vieira, Trivelin e Megda (2010) observaram, em experimento de campo, a redução do teor de N da folha +1 a partir dos 60 dias, tanto nas testemunhas, com nas plantas adubadas com uréia e nitrato de amônio, porém não nas adubadas com sulfato de amônio.

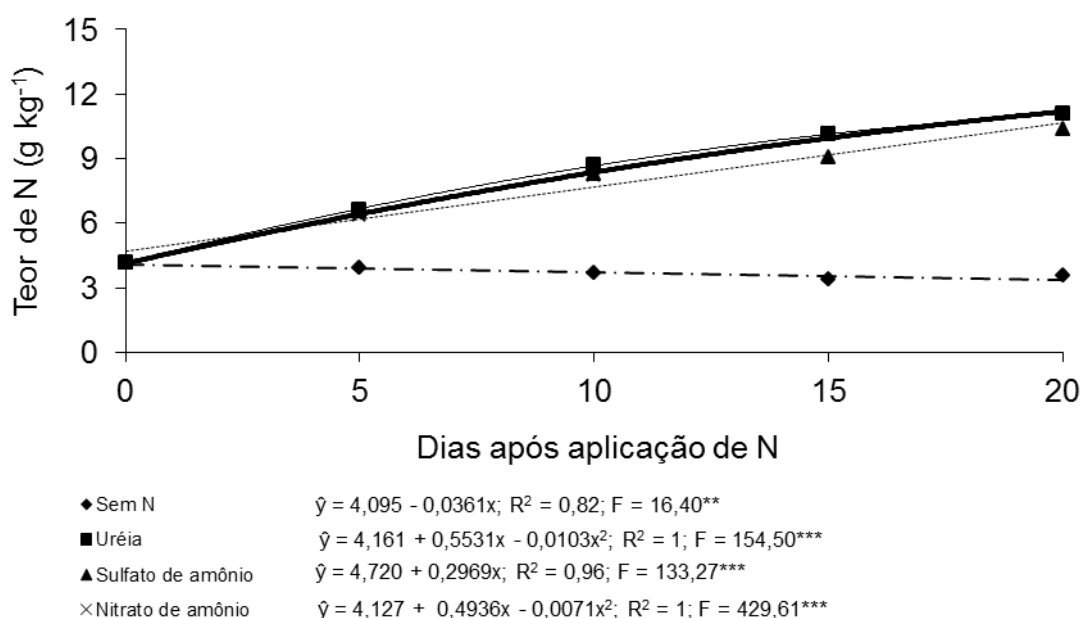


Figura 17. Teor de N total na parte aérea de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação superficial de soluções de uréia, nitrato de amônio e sulfato de amônio. *** , ** = significativo aos níveis de 0,1 e 1% de probabilidade, respectivamente

No sub-experimento controle, não se observou influência do número de dias após a aplicação de nitrogênio, sobre o acúmulo de N, apresentando valor médio de $15,03 \text{ mg planta}^{-1}$ (Figura 18). Independente da fonte (uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio), notou-se aumentos lineares para o acúmulo de N na parte aérea, os quais atingiram os valores de 75,81; 65 e 68,62 mg planta^{-1} aos 20 dias após a adubação, respectivamente. No momento da aplicação do N, os acúmulos de N foram de 11,14; 10,72 e 12,02 mg planta^{-1} (Figura 18).

A fonte uréia foi a que proporcionou maior valor médio de acúmulo de N aos 20 dias. Com esta fonte, o N demoraria mais para ser absorvido na fase inicial, pois primeiramente, antes de passar para a forma de nitrato, a uréia deve ser hidrolisada, o que pode ocorrer em maiores proporções em ambiente de solo, a campo, em até 8 dias segundo Costa, Vitti e Cantarella (2003). Além disso, no substrato usado, este tempo pode ter sido prolongado. Todavia, o comportamento foi semelhante às outras fontes. A uréia proporcionou altos teores e acúmulos de N, porém, as plantas adubadas com esta fonte foram as que apresentaram menores aRN aos 20 dias da aplicação (Figura 13), por isso, as plantas podem ter absorvido grande parte do N na forma de NH_4^+ .

Em estudo com milho, Lara Cabezas e Couto (2007) observaram que, com o uso do N na forma amoniacal ou amídica, aos 11 ou 22 dias, as duas fontes testadas não diferiam quanto à promoção do acúmulo de N, o que só foi notado aos 44 dias após a adubação, com superioridade do sulfato de amônio. Contrastando com Lange et al. (2010), em estudo com milho, que observaram que a recuperação do nitrogênio da fonte sulfato de amônio aplicado em cobertura foi superior ao da uréia para a mesma dose, ao final do ciclo produtivo.

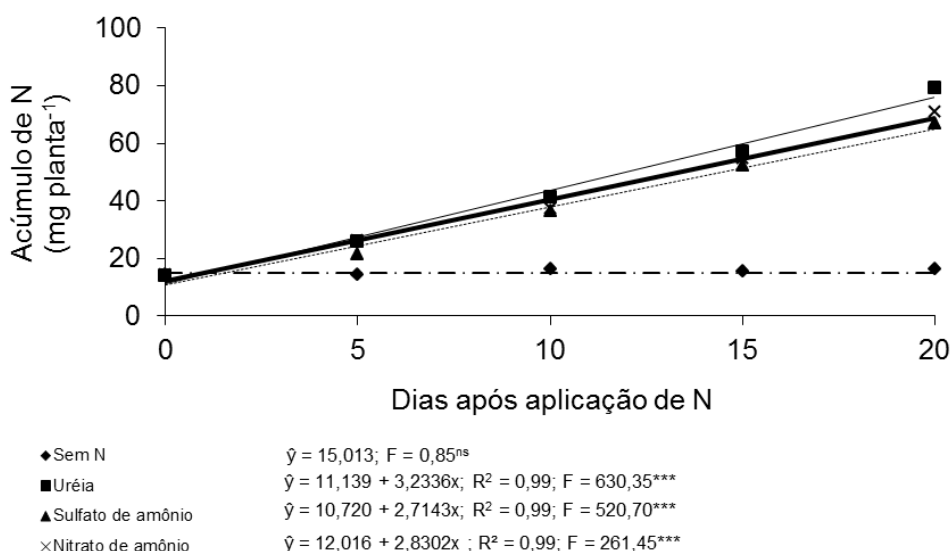


Figura 18. Acúmulo de N total na parte aérea de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função do tempo após a aplicação superficial de soluções de uréia, nitrato de amônio e sulfato de amônio. ^{ns} = não significativo, ^{***} = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

3.4 Conclusões

1 - A atividade da enzima RN é máxima por volta dos 13 dias após a aplicação da uréia em plantas de cana-de-açúcar deficientes em N.

2 - A dinâmica de absorção de N proveniente da uréia se altera em função da textura do substrato e nível de deficiência de N das plantas de cana-de-açúcar.

3 - Plantas de cana-de-açúcar, em condições de deficiência de N, apresentam a mesma dinâmica de absorção de N e de atividade da RN até os 20 dias da adubação, independente da fonte aplicada. Sendo que, com o uso da fonte uréia a absorção de N se dá um pouco mais rápido, e a atividade da RN é aumentada mais rapidamente com a aplicação de nitrato de amônio.

3.5 Referências

- ABAYOMI, Y. A.; ETEJERE, E. O.; FADAYOMI, O. Effect of nitrogen level and water deficit on nitrate reductase activity NRA from leaves of two sugarcane cultivars - Co 957 1001. **Turrialba**, San Jose, v. 38, n. 4, p. 352-358, 1988.
- ALMEIDA, A. C. S.; SOUZA, J. L., TEODORO, I.; BARBOSA, G. V. S., MOURA FILHO, G., FERREIRA JÚNIOR, R. A. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação à disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1441-1448, 2008.
- AHMAD, A.; KHAN, I.; ABROL, Y. P.; ABDIN, M. Z. Relationship between soil nitrate content and activities of NADH: and NAD(P)H: nitrate reductases in Indian mustard. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 2, p. 295-296, 2003.
- BASTO, J. C. H. A. G.; CAZETTA, J. O.; PRADO, R. M. Materiais corretivos e nitrogênio na nutrição e na produção de matéria seca de cana-de-açúcar cultivada em vaso. **Interciencia**, Caracas, v. 35, n. 1, p. 55-58, 2010.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 139-149, 2003.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ V., V. H., BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Viçosa, 2007. cap. 7. p. 375-470.

CARVALHO, P. G; AIDAR, M. P. M.; ZAIDAN, L. B. P.; CARVALHO, M. A. M. Aspectos do crescimento e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas a diferentes fontes de nitrogênio. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 89-97, 2006.

COPERSUCAR. **Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas**. São Paulo: Copersucar, 1989. 5 p. (Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25).

COSTA, M. C. G.; VITTI, G. C.; CANTARELLA, H. Volatilização de N-NH₃ de fontes nitrogenadas em cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 631-637, 2003.

CRAWFORD, N. M.; KAHN, M. L.; LEUSTEK, T.; LONG, S. R. Nitrogen and sulfur. In: BUCHANAN, W.; GRUÍSSEM, R. JONES, R. **Biochemistry e Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 16. p. 786-849.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: CNPS, 2006. 306 p.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. T.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R.; Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. esp., p. 2763-2770, 2008.

FRESCHI, L.; NIEVOLA, C. C.; RODRIGUES, M. A. R.; DOMINGUES, D. S.; VAN SLUYS, M. A.; MERCIERA, H. Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, n. 3, p. 201-212, 2009.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MØLLER, I. S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2012. cap. 6. p. 135-189.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.

IDO, O. T.; EDAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; WEBER, H.; BUSO, P. H. M.; OLIVEIRA, R. A. Crescimento e distribuição radicial de três cultivares de cana-de-açúcar, em cana soca, em dois tipos de solo, em rizotron. I. uso do WinRHIZO, **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 21-26, 2006.

LANGE, A.; LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O. Sulfato de amônio e uréia em cobertura no milho em semeadura direta no Cerrado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 6, p. 817-824, 2010.

LARA CABEZAS, W. A. R.; COUTO, P. A. Imobilização de nitrogênio da uréia e do sulfato de amônio aplicado em pré-semeadura ou cobertura na cultura de milho, no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 739-752, 2007.

LATIFA, I. C.; ANGGARWULAN, E. Nitrogen content, nitrate reductase activity, and biomass of kimpul (*Xanthosoma sagittifolium*) on shade and nitrogen fertilizer variation. **Nusantara Bioscience**, Central Java, v. 1, n. 2, p. 65-71, 2009.

LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. **Biochemical Journal**, London, v. 415, n. 1, p. 11-19, 2008.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture, **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 7, p. 1141-1157, 2010.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Sofia, v. 1, n. 3, p. 386-414, 2012.

MELO, W. J.; MELO, G. M. P.; BERTIPAGLIA, L. M. A.; MELO, V. P. **Experimentação sob condições controladas**. 1 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1998. 82 p.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 4, p. 1-36, 2004.

NETO, A. P.; FAVARIN, J. L.; TEZOTTO, T.; GUERREIRO, D. F. M. Atividade da redutase do nitrato em função da dose de nitrogênio ao cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais eletrônicos...** Brasília Embrapa - Café, 2011. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/4115/323.pdf?sequence=2>. Acesso em: 02 out. 2013.

NICODEMUS, M. A.; SALIFU, K. F.; JACOBS, D. F. Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. **Trees**, Berlin, v. 22, n. 5, p. 685-695, 2008.

OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C. Aspectos agronômicos da ureia tratada com inibidor de uréase. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8, n. 2, p. 403-414, 2012.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**, São Paulo: Editora Unesp, 2008. 407 p.

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. p. 231-244. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M. E.; LOPES, A. S.; BATAGLIA, O. C. **Análise química do solo para fins de fertilidade**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 170 p.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; HAGA, K. I. Atividade da redutase do nitrato em folhas de cafeeiro em função da adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 269-276, 2007.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019045>>. Acesso em: 15 maio 2013.

SAMUELSON, M. E.; OHLEN, E.; LIND, M. LARSSON, C. M. Nitrate regulation of nitrate uptake and nitrate reductase expression in barley grown at different nitrate: ammonium ratios at constant relative nitrogen addition rate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, n. 2, p. 254-260, 1995.

SILVA, A. A.; DELATORRE, C. A. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 2, p. 152-153, 2009.

SILVA, E. F. **Efeito da adubação nitrogenada sobre a variação estacional das frações nitrogenadas, atividade da nitrato-redutase, e carboidratos solúveis em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp, cv. NA 56-79), em condições de campo**. 1986. 163 f. Dissertação, (Mestrado em Agronomia-Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, 1986.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de n e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 7-15, 1990.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. cap. 9, p. 216-252.

SOUZA, S. R.; SANTOS, A. M.; FERNANDES, M. S.; GLASS, A. D. M. Nitrate transporters in higher plants: a general view. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, Seropédica, v. 26, n. 2, p. 78-86, 2006.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, n. 10, p. 1005-1024, 2000.

VALE, D. W.; PRADO, R. M.; AVALHÃES, C. C.; HOJO, R. H. Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 2, p. 189-196, 2011.

VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. Induction of nitrate reductase host gene expression has a negative effect on the expression of transgenes driven by the nitrate reductase promoter. **Plant Science**, Limerick, v. 107, n. 1, p. 95-104, 1995.

VENKATESAN, S.; GANAPATHY, M. N. K. Nitrate reductase activity in tea as influenced by various levels of nitrogen and potassium fertilizers. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Athens, v. 35, n. 9-10, p. 1283-1291, 2004.

VIEIRA, M. X.; TRIVELIN, P. C. O. MEGDA, M. M. Atividade da enzima redutase do nitrato em cana-de-açúcar. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 8., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 6., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. **Anais...** Guarapari: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010. 1 CD-ROM.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETTO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 239-269.

4 CAPÍTULO 4 – Atividade da redutase do nitrato em diferentes cultivares de cana-de-açúcar e sua relação com a nutrição nitrogenada

RESUMO – Assim como o teor foliar de N varia em função do genótipo de cana-de-açúcar, a atividade da enzima RN pode variar também. Vários autores constataram diferenças do nível de atividade da RN em cana-de-açúcar, porém, não estudaram a associação da aRN com variáveis nutricionais e produtivas. Os objetivos deste capítulo foram comparar cultivares de cana-de-açúcar quanto ao nível de atividade da RN e estudar sua relação com variáveis produtivas e nutricionais. Foram avaliados dois experimentos: um foi realizado em casa de vegetação, usando como substrato dos vasos de 4 dm³, areia e vermiculita, com fertilidade devidamente corrigida. Os vasos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados, onde foram crescidas 10 cultivares de cana-de-açúcar, com 4 repetições cada, ressalta-se que as análises estatísticas foram realizadas em blocos. As coletas foram realizadas após 10 a 14 dias da aplicação de 50 mg dm⁻³ de N, na forma de solução de uréia. As variáveis avaliadas foram: atividade da RN, massa seca de parte aérea e de sistema radicular, teor e acúmulo de N na parte aérea e altura de plantas, eficiências no uso e da absorção de N, além do teste de correlação de Pearson entre as variáveis. No experimento 2, foram coletadas amostras foliares de 40 canaviais comerciais localizados em Jaboticabal - SP, e determinou-se a atividade da RN, teor de N total e teor de nitrato, além disso, obteve-se no momento da coleta de material vegetal, a altura de plantas. Para avaliar a relação entre as variáveis, os dados obtidos foram submetidos ao teste de correlação de Pearson. Os resultados mostraram que o nível de estimativa da atividade da enzima RN varia com a cultivar de cana-de-açúcar e que em condições controladas, independente da cultivar de cana-de-açúcar, a atividade da RN correlaciona positivamente com o teor de N na parte aérea e negativamente com a eficiência de utilização de N. Contudo, em canaviais comerciais, localizados na região de maior expressão do setor sucroalcooleiro do país, a atividade da RN em folhas de cana-de-açúcar correlaciona, em direções opostas, com o teor de N foliar e com a altura de plantas. E ainda, que a atividade da enzima não se associa com o teor de nitrato foliar.

Palavras-Chave - *Saccharum* spp., adubação nitrogenada, atividade enzimática, eficiência no uso de nitrogênio, nitrato, nitrogênio

4.1 Introdução

De modo geral, as recomendações de N para as culturas não são baseadas na análise de solo por uma série de fatores, e isto não é diferente para a cana-de-açúcar (CANTARELLA, 2007; VITTI et al., 2008). A diagnose foliar para as recomendações ainda é uma técnica que não se firmou no Brasil, devido a fatores como solo, clima, época de amostragem e genótipo (RAIJ; CANTARELLA, 1997). No estudo de Gallo, Hiroce e Alvarez (1968), que estabeleceram uma faixa crítica de valores para a diagnose foliar de cana-de-açúcar, através de um levantamento nas principais usinas do estado de São Paulo, foi relatada a observação de diferenças entre cultivar, idade da cana na amostragem e tipo de cultura (cana-planta ou soca). Na época, os autores comentaram sobre as dificuldades devido aos fatores interferentes.

Em cana-de-açúcar, o fator genótipo (cultivar) é um dos mais importantes, por interferir de forma acentuada na composição química foliar, como comentado na revisão de Vitti et al. (2008). Além disso, o potencial genético da planta pode determinar uma maior facilidade ou não de absorção de N (PRADO, 2008).

As cultivares de cana-de-açúcar se diferenciam quanto a eficiência no uso de nitrogênio (EUN) (DONATO et al., 2003), ou seja, capacidade da planta em converter N em biomassa. Ou ainda, diferenciam pela eficiência de absorção de N (EAB) devido ao volume e comprimento do sistema radicular e, taxas de absorção por comprimento radicular (PRADO, 2008), e conseqüentemente, na capacidade de acumular N nos tecidos.

A criação de métodos enzimáticos para a indicação do estado nutricional, ou mesmo, para a recomendação de N seria muito interessante, pois, geralmente, a concentração total é fracamente correlacionada com a disponibilidade do nutriente, no ponto de vista fisiológico (RÖMHELD, 2012), porém, muitos fatores, tais como os climáticos e estágio fenológico da planta (BINBOL; ADEBAYO; KWON-NDUNG, 2006; REIS et al., 2009), interferem nos resultados e precisam ser elucidados.

Em função do importante papel regulador na nutrição e produtividade de plantas (SOUZA; STARK; FERNANDES, 2002; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012), desde a década de 60 tem sugerido que a atividade da enzima redutase do nitrato

(RN) pode ser utilizada na indicação do estado nutricional, em nitrogênio, das culturas (BEEVERS; HAGEMAN, 1969). Alguns estudos foram desenvolvidos com gramíneas neste segmento (BAR-AKIVA; SAGIV; LESHEM, 1970; JOHNSON; WHITTINGTON; BLACKWOOD, 1976), inclusive, foi realizado na Costa Rica um experimento testando a possibilidade do uso da RN como indicadora do estado nutricional de N para cana-de-açúcar em comparação com outras culturas (VILLALOBOS; CARVAJAL, 1977). Na ocasião, os autores observaram que os resultados variam em função da espécie e da capacidade do genótipo acumular nitrato nos tecidos.

É possível que estas diferenças possam ou não refletir no nível de expressão da atividade da RN, pois, provavelmente, quanto mais nitrogênio na forma de nitrato o genótipo acumula, maior poderá ser a atividade da enzima, devido ao teor de nitrato ser indutor da síntese da RN (SILVA, 1989; CAMPBELL, 1999; LILLO, 2008; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012).

Assim como os teores foliares de nitrato ou nitrogênio total variam em função do genótipo (JIANG; SULLIVAN; HULL, 2000; KUMAR; SINGH, 2002; OLIVEIRA et al., 2010), também a atividade da enzima RN pode variar. Em milho, Oliveira et al. (2013) avaliaram a aRN em dez genótipos cultivados sobre as mesmas condições e verificaram valores que variaram de 0,09 a 0,75 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{NO}_2^-$.

Vários autores constataram diferenças do nível de atividade da RN em cana-de-açúcar, porém não fizeram um estudo de correlação para avaliar a associação da aRN com o teor de N total ou com o teor de NO_3^- (ABAYOMI; ETEJERE; FADAYOMI, 1988; OLIVEIRA; MAGALHÃES, 1989; DONATO et al., 2004). Em estudo com plantas da gramínea “Kentucky bluegrass”, Jiang e Hull (1998) observaram alta correlação negativa da aRN com a EUN. Contudo, Oliveira et al. (2013) observaram correlações negativas moderadas da atividade da RN com a EUN e EAB, entretanto, concluíram que a aRN não é um bom parâmetro fisiológico para discriminar genótipos de milho eficientes no uso de nitrogênio em condições onde a concentração de N é baixa.

Assim, os objetivos foram: comparar cultivares de cana-de-açúcar quanto ao nível de atividade da RN e estudar sua relação com variáveis produtivas e nutricionais.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita

Instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (coberta com vidro) na FCAV/UNESP em Jaboticabal, entre os meses de agosto e novembro de 2012. Os tratamentos consistiram de 10 cultivares de cana-de-açúcar: PO88-62, SP80-3280, SP81-3250, RB72454, RB855156, RB867515, IAC87-3396, IACSP93-3046, IACSP95-3028, IACSP95-5000 (Figura 1), comparadas quanto a variáveis enzimáticas, nutricionais e produtivas.



Figura 1. Mini-toletes das cultivares de cana-de-açúcar utilizadas no experimento 4

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, perfazendo um total de 40 unidades experimentais. Cada parcela foi composta por uma planta de cana-de-açúcar crescida em vaso com 4 dm³ de mistura de areia (granulometria fina) e vermiculita comercial, na proporção de 2:1 (v/v) respectivamente. A amostra do substrato apresentou as seguintes propriedades químicas: pH em CaCl₂ = 6,5; M.O.= 3,0 g dm⁻³; P (resina) = 5,0 mg dm⁻³; K = 0,5 mmol_c.dm⁻³; Ca = 5,0 mmol_c.dm⁻³; Mg = 64,0 mmol_c.dm⁻³; H+Al = 7,0 mmol_c.dm⁻³; SB= 69,5 mmol_c.dm⁻³; CTC = 76,5 mmol_c.dm⁻³ e V = 91%.

Para a correção da fertilidade, baseou-se nas indicações de Raij e Cantarella (1997). Foi necessária a incorporação do equivalente a 90 e 50 mg dm⁻³ de P₂O₅ e K₂O, que foi fornecida na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio respectivamente. Ressalta-se que o nitrogênio só foi aplicado posteriormente, e que o K₂O foi parcelado 2/3 no plantio (50 mg dm⁻³) e 1/3 em cobertura, na forma de solução (25 mg dm⁻³).

As mudas utilizadas foram produzidas nos meses de julho e agosto de 2012 a partir de mini-toletes oriundos da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Jaú (APTA Polo Centro Oeste), sendo germinados em copos de 0,5 dm³ preenchidos com areia de granulometria fina. Após 43 dias da germinação, as plantas consideradas uniformes foram transplantadas para os vasos definitivos.

Após o transplante, objetivando fornecer macronutrientes e micronutrientes às plantas, semanalmente fazia-se a aplicação via substrato de solução contendo pequena quantidade de S, Mg, Ca, Fe, Zn, B, Mn, Cu e Mo conforme Hoagland e Arnon (1950). Aos 30 dias aplicou-se sobre o substrato o restante da dose de K na forma de solução de KCl (25 mg dm⁻³ de K₂O). Após 75 dias do transplante, as plantas apresentavam-se cloróticas sugerindo deficiência de nitrogênio. Foi feita, então, a aplicação de solução de uréia contendo o equivalente a 100 kg ha⁻¹ de N, ou seja, 50 mg dm⁻³ de N na superfície do substrato de todas as unidades experimentais.

A irrigação foi feita diariamente com base no método de pesagem dos vasos (MELO et al., 1998), procurou-se manter a umidade a 60% da capacidade de campo. A cada 15 dias se fazia o rodízio dos vasos para evitar possíveis influências do ambiente, sendo mantida entre cada vaso, uma distância de cerca de 10 cm. Para evitar a proliferação de lagartas, as plantas eram inspecionadas regularmente e fazia-se a catação manual. O controle de infestações de ácaro foi realizado com acaricida comercial na dosagem recomenda na bula do produto.

Coleta do experimento e preparo das amostras

A coleta do experimento foi realizada a partir do 13º dia após a adubação com N, e foram realizadas em quatro dias, sendo cada dia considerado um bloco devido a impossibilidade de se analisar a aRN em todo material no mesmo dia. Em cada dia

de avaliação, a altura das plantas foi mensurada. Tomou-se como medida, o comprimento entre o colo e o ponto de inserção da folha do tipo +1. As folhas do tipo 0 (zero) foram coletadas, sendo estas reservadas em caixa de isopor com gelo para a determinação da aRN. Em seguida fez-se o corte basal das plantas. O material vegetal foi então lavado com solução detergente e enxaguado com água deionizada. As raízes foram separadas do substrato por cuidadosa lavagem em água corrente.

As amostras obtidas foram individualizadas em sacos de papel e levadas para uma estufa de circulação fechada, na qual permaneceram sob a temperatura de 65 °C até os valores ficarem constantes nas pesagens. Após isso, procedeu-se a pesagem em balança analítica para a obtenção dos valores de biomassa seca da parte aérea e sistema radicular, ressaltando que se obtiveram separadamente as massas de tolete remanescente e raiz. Em seguida, a parte aérea foi triturada em moinho com câmara de aço inoxidável, e guardadas para posterior análise do teor de nitrogênio total.

Determinações analíticas na parte aérea das plantas

Atividade da redutase do nitrato (aRN)

A aRN foi determinada usando o método previamente padronizado, descrito no Capítulo 2, que consistiu na coleta da folha do tipo 0, às 13 horas, levando-as imediatamente para o laboratório onde procedeu-se as análises. Ressalta-se que devido a uma pequena quantidade de material vegetal disponível, utilizou-se toda a folha, com exceção da nervura principal. A folha analisada foi a do tipo 0, pois esta estava maior que a folha do tipo +1. Também não foi possível o corte com furador de rolha, com isso, o tecido foliar foi cortado com tesoura em secções de aproximadamente 0,5 cm. Pesou-se em balança analítica 500 mg de tecidos por amostra, sendo estas colocadas em frascos escuros, e, devido ao tempo de preparo entre cada amostra, manteve-se os frascos com as amostras dentro de uma caixa de isopor com gelo até a adição do meio de incubação. Todas as repetições foram analisadas em triplicatas.

Após o preparo de todo material, cada frasco foi preenchido com 10 mL do meio de incubação. O meio foi composto por 2,5 mL de solução tampão com concentração de 285 mmol dm⁻³ de KH₂PO₄ (Merck®) a pH 7,3; 2,5 mL de KNO₃

(Nuclear[®]) a 300 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 (Reagen[®]) a 0,6% (v/v) e 4 mL de água deionizada. Os frascos foram colocados em um dessecador de vidro e submetidos ao vácuo, com uma pressão negativa de 600 mm Hg por 3 minutos ininterruptos, com posterior reintrodução do ar. Em seguida, os frascos foram transferidos para incubação em banho-maria a $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (± 1), no escuro, durante 90 min. As amostras eram agitadas de 15 em 15 min.

Ao término do tempo de incubação, adicionou-se 1 mL de solução de sulfanilamida a 1% em HCl 3 mol dm^{-3} para interromper a reação. O nitrito produzido em função da presença da enzima RN foi determinado por uma alíquota de 0,5 mL do meio de incubação. A alíquota foi acrescentada a 0,5 mL de solução composta por sulfanilamida (Vetec[®]) 10 g dm^{-3} em HCl 3 mol dm^{-3} (Merck[®]) e 0,5 mL de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina $0,2 \text{ g dm}^{-3}$ (Sigma[®]). A solução foi homogeneizada e após 20 minutos, diluída a 4 mL com água deionizada, e a absorbância (540 nm) foi medida em espectrofotômetro, modelo Spectronic 20D.

Para calcular a quantidade de nitrito contida nas amostras, fez-se uma curva padrão de nitrito como descrito no Capítulo 2. A curva padrão obtida definiu a equação: $\hat{y} = 0,0164 + 0,0551x$, por meio da qual foram determinadas as concentrações de nitrito na solução. A aRN foi calculada com base nesta equação, e foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de NO_2^- .

Determinação de nitrogênio na parte aérea (N%)

A análise para a determinação do teor de nitrogênio total na parte aérea foi realizada pelo método Kjeldahl descrito em Embrapa (2009). Ressalta-se que para determinar o teor de N, não se contabilizou a folha do tipo 0, utilizada de forma destrutiva para a análise da aRN, com isso, as estimativas, tanto de acúmulo de N como também de MSPA, estão sub-estimadas.

Cálculos dos índices nutricionais

A partir dos dados de matéria seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR), e, do conteúdo de nitrogênio acumulado na planta (Acúmulo de N na MSPA), foi possível calcular dois dos índices nutricionais descrito em Prado (2008), onde empregou-se as relações a seguir para os cálculos: Eficiência de absorção (EAB) =

Acúmulo de N na MSPA (mg) / MSR (g) e Eficiência de utilização (EU) = (g de MSPA²) / Acúmulo de N na MSPA(mg).

Análises estatísticas

Os dados obtidos no experimento de casa de vegetação foram submetidos a análise para a verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Sisvar, ao passo que, a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Cochran ($p > 0,05$) no programa estatístico Saeg. Os dados em que não foram verificadas normalidade e homogeneidade, foram submetidos às devidas transformações. Em seguida, procedeu-se à análise de variância pelo teste F. Quando significativo, as médias foram comparadas usando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o programa estatístico Sisvar. Por fim, as variáveis foram avaliadas pela correlação de Pearson, no programa estatístico Saeg. Considerou-se correlação forte, valores de r ($\pm$) compreendidos entre 0,7 a 1, moderada 0,3 a 0,7 e fraca de 0 a 0,3 (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009).

4.2.2 Experimento 2: Estudo de correlação entre as variáveis obtidas de plantas de cana-de-açúcar de canaviais comerciais

Procedimentos nas coletas

As coletas de material vegetal foram realizadas ao acaso em 40 canaviais localizados no município de Jaboticabal – SP, no período de 22/06 a 28/06/2012 (Figura 2). Ressalta-se, que eram desconhecidos os parâmetros genótipo e idade das plantas de cana-de-açúcar, condições edafoclimáticas e de forma geral, o sistema de manejo adotado em cada área. Isso, objetivando a observação da existência, ou não, de correlação da aRN com o teor de N foliar, como também com outras variáveis, em diversas condições de cultivo. Os dados climáticos do município no período de realização do estudo estão apresentados na Figura 3.

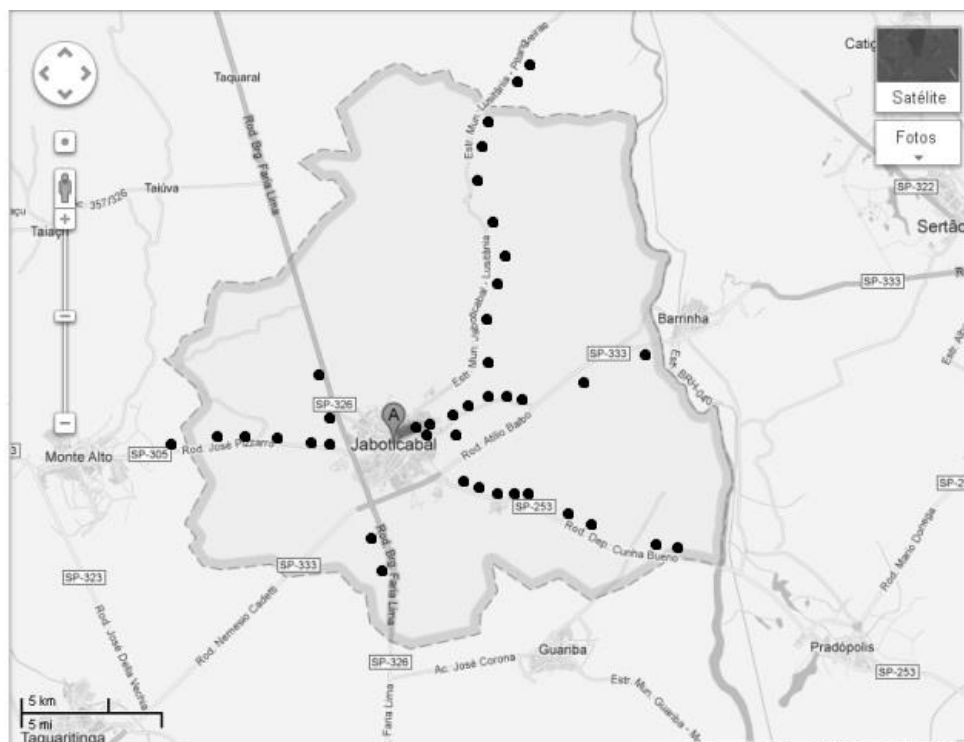


Figura 2. Referencial da localização aproximada dos canaviais comerciais amostrados em Jaboticabal-SP, ● = Localização do talhão (Adaptado de Google Maps).

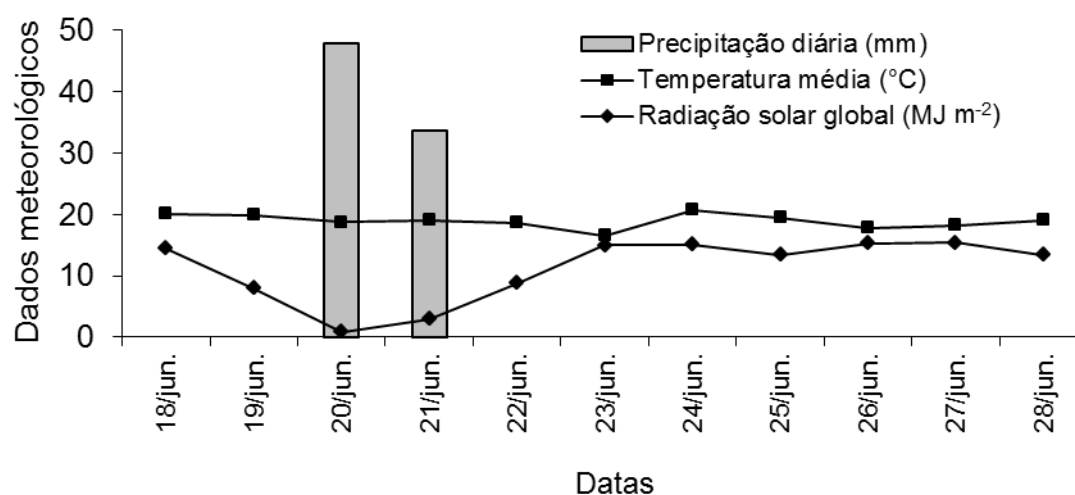


Figura 3. Dados meteorológicos diários obtidas pela Estação Agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, referentes ao período de realização do experimento de correlação da aRN com o teor de N foliar (Jaboticabal - SP, 2012)

A obtenção das amostras foi feita da seguinte forma: Coletaram-se em cinco touceiras de cana-de-açúcar, uma folha do tipo 0 (zero) para a determinação da aRN, dando um total de cinco folhas ao acaso. Retiraram-se 20 cm centrais das folhas, no sentido do comprimento e colocou-se em sacos plásticos. Estes foram armazenados em bolsa térmica com gelo no fundo, coberto por folhas de papel. Isso, para evitar congelamento dos tecidos foliares, o que poderia causar injúrias nos tecidos e prejudicar a análise da aRN. Em seguida, coletou-se da mesma forma, e nas mesmas plantas, a folha do tipo +1 para a determinação dos teores foliares de N e nitrato.

Encaminharam-se as amostras, o mais rápido possível para o laboratório, onde foi procedida a preparação e análise da aRN nas folhas do tipo 0 (zero) conforme descrito no experimento 1. Todas as análises foram realizadas com quatro repetições por lavoura amostrada.

Quanto às folhas do tipo +1, foram lavadas com solução detergente (0,15 v/v) e água deionizada, retiraram-se as nervuras e secou-as em estufa a 65 °C até peso constante. As amostras foram trituradas em moinho com câmara de aço inoxidável e procedeu-se a determinação do teor de N pelo método Kjeldahl descrito em Embrapa (2009). O teor de N-NO_3^- foliar foi determinado pelo método de Cataldo et al. (1975) com leves adequações no preparo do extrato e na obtenção da cota e leitura, como descrito a seguir:

Na fase de extração do nitrato, primeiramente, obteve-se amostras foliares, finamente moídas, de 250 mg cada. Estes tecidos desidratados foram oriundos da folha do tipo +1 de cana-de-açúcar cultivada a campo.

Em seguida, adicionou-se, por amostra, 2 mL de água deionizada a $\pm 85^\circ\text{C}$ (Figura 4A), e incubou-se a 60°C em banho Maria por 20 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 15 min em centrífuga Fanem Excelsa[®] II, modelo 206 BL, a 2700 rpm. O sobrenadante foi recolhido em um tubo graduado e repetiu-se o procedimento de incubação e centrifugação por mais três vezes, recuperando sempre o sobrenadante (Figura 4B). Ao final dos quatro ciclos (banho Maria-centrífuga), anotou-se o volume obtido e inseriram-se os tubos em caixa de isopor com gelo, onde permaneceram por 1 h, para a precipitação de proteínas. Ao final do período, centrifugaram-se as amostras conforme descrito anteriormente.

Para o preparo da cota de leitura, foram feitos testes preliminares seguindo o método de Cataldo et al. (1975), onde se verificou leituras de absorbância muito baixas. Com isso, foi necessária a coleta de 80 μL de extrato ao invés de 40 μL , porém, o extrato foi evaporado em estufa a 70 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2,5$ h) com finalidade de concentrar o extrato, pois, 40 μL é o limite volumétrico para que ocorra a reação adequadamente.

Em seguida adicionou-se em cada alíquota concentrada, 160 μL de solução composta por ácido salicílico 50 g dm^{-3} em H_2SO_4 concentrado. Agitou-se por 10 s, e, após 20 min de repouso, completou-se o volume para 4 mL com NaOH (2M). Por fim, procedeu-se as leituras em espectrofotômetro a 410 nm.

Para o cálculo da quantidade de nitrato contida nas amostras, primeiro, fez-se diluição seriada de uma solução padrão de nitrato de sódio (Reagen[®]) (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de N-NO_3^-), e, para o preparo da curva padrão obteve-se alíquotas de 40 μL cada, seguindo-se a mesma rotina descrita para as amostras. A curva padrão obtida definiu a equação: $\hat{y} = 0,0093 + 0,1726x$, ($R^2 = 1$), por meio da qual, foram determinadas as concentrações de nitrato na solução. O teor de nitrato foliar foi calculado com base nesta equação, e foi expresso em mg g^{-1} de tecido seco.

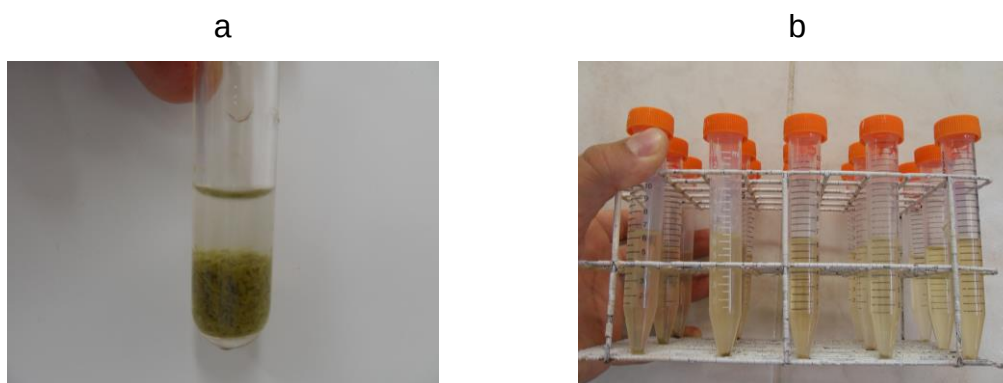


Figura 4. Amostras para a determinação do teor de nitrato (a) e extrato coletado após o processo de centrifugação (b)

Análises estatísticas dos dados

Para avaliar a relação entre as variáveis aRN, teor de N total, teor de nitrato e altura, os dados obtidos nas coletas a campo (40 observações, sendo uma por canavial), foram submetidos a análise para a verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Sisvar. Em seguida,

foram avaliados pela correlação de Pearson no programa estatístico Saeg. Considerou-se correlação forte, valores de r ($\pm$) compreendidos entre 0,7 a 1, moderada 0,3 a 0,7 e fraca de 0 a 0,3 (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2009).

4.3 Resultados e Discussão

Em casa de vegetação, as plantas com maiores teores de N na parte aérea apresentaram alta aRN (Tabela 2), da mesma forma que o observado no campo porém, os teores foram avaliados nas folhas +1 (Figura 12).

No campo, as menores aRN foram observadas em plantas mais altas (Figura 13), enquanto que, em casa de vegetação, não se observou correlação entre estas duas variáveis (Tabela 2). Observou-se ainda, que no campo, as plantas de maiores alturas apresentaram menores teores de N na folha +1 (Figura 14). Em contrapartida, em condições controladas, não se observou relação da altura com o teor de N na parte aérea (Tabela 2). Uma explicação para estas observações é que, no experimento realizado em campo, além do fator genótipo, outros fatores, como por exemplo, o estágio fenológico, o manejo da adubação e fatores edafoclimáticos, têm forte influência na assimilação de nitrato (PURCINO et al., 1994). Por outro lado, no experimento de casa de vegetação, estas variáveis foram influenciadas apenas pelas diferenças genótípicas dos materiais biológicos.

4.3.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato composto por areia mais vermiculita

Ao se comparar as cultivares quanto às respostas enzimáticas, produtivas e nutricionais, observou-se significância estatística para todas, exceto para a EAB (Tabela 1). Esta falta de resposta demonstra a igual capacidade das raízes das plantas comparadas, em extraírem N do meio de cultivo. Para fins de comparações com a literatura, os valores médios das variáveis analisadas no experimento estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para as variáveis analisadas no experimento 1

TRATAMENTOS	aRN	Altura	MSPA	MSR
Cultivares (F)	12,78***	31,76***	14,80***	8,35***
D.M.S.	0,36	4,34	1,65	0,92
Média geral	1,20	29,30	6,04	2,21
C.V. (%)	12,27	6,09	11,23	17,19
	Teor de N	Acúmulo de N	EU	EAB
Cultivares (F)	5,60***	11,28***	14,59**	1,78 ^{ns}
D.M.S.	1,25	19,50	0,16	14,73
Média geral	11,87	71,19	0,52	33,41
C.V. (%)	4,32	11,26	13,02	18,12

^{ns}, ***, * = não significativo e significativo aos níveis de 0,1 e 5% de probabilidade, respectivamente

Os resultados da análise estatística pelos testes F (Tabela 1) e de Tukey ($p < 0,05$) apontaram a cultivar de cana-de-açúcar IACSP95-3028 (C8), como a que mais expressou a atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) nas folhas (Figura 5). A média da atividade nesta cultivar foi de $1,83 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- . As menores atividades foram observadas nas cultivares SP80 3280, RB72454 e RB867515, nas quais, as médias atingiram 1,04; 0,96 e 0,97 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- , respectivamente. Atividades da enzima em níveis intermediários aos observados, nestas cultivares citadas, foram observadas nas cultivares C1, C4, C10, C3, C7 e C2; com estimativas que variaram de 1,06 a $1,40 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- (Figura 5).

Estas variações da aRN nas diferentes cultivares podem estar relacionadas às peculiaridades de cada genótipo em utilizar o nitrogênio, pois o potencial genético pode determinar uma maior facilidade, ou não, de absorção de N (PRADO, 2008) e, sabe-se que a enzima RN é a enzima “chave” na regulação do metabolismo do nitrogênio (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012). Em plantas de milho, por exemplo, os híbridos modernos são mais produtivos porque têm maior capacidade de

absorção (maiores V_{max}) e assimilação de N (maior atividade da RN), mas, são mais exigentes em adubação que os genótipos antigos por causa da perda de afinidade do sistema de transporte (maiores K_m) (PURCINO et al., 1994). Em vários estudos com diferentes cultivares das gramíneas “Kentucky bluegrass”, cana-de-açúcar e milho, foram observadas diferenças na atividade da enzima RN (PURCINO et al., 1994; JIANG; HULL, 1998; KUMAR; SINGH, 2002; DONATO et al., 2004).

Dentre as cultivares de cana-de-açúcar estudadas por Donato et al. (2004), não esteve presente nenhuma das estudadas na atual pesquisa, porém, os diferentes níveis de atividade da enzima foram associados às taxas fotossintéticas, pois no genótipo que foi observado a maior atividade da RN também se observou o maior conteúdo de clorofila *a* e *b*, e, é conhecido que a aRN é regulada também por produtos da fotossíntese (CRAWFORD et al., 2000; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012).

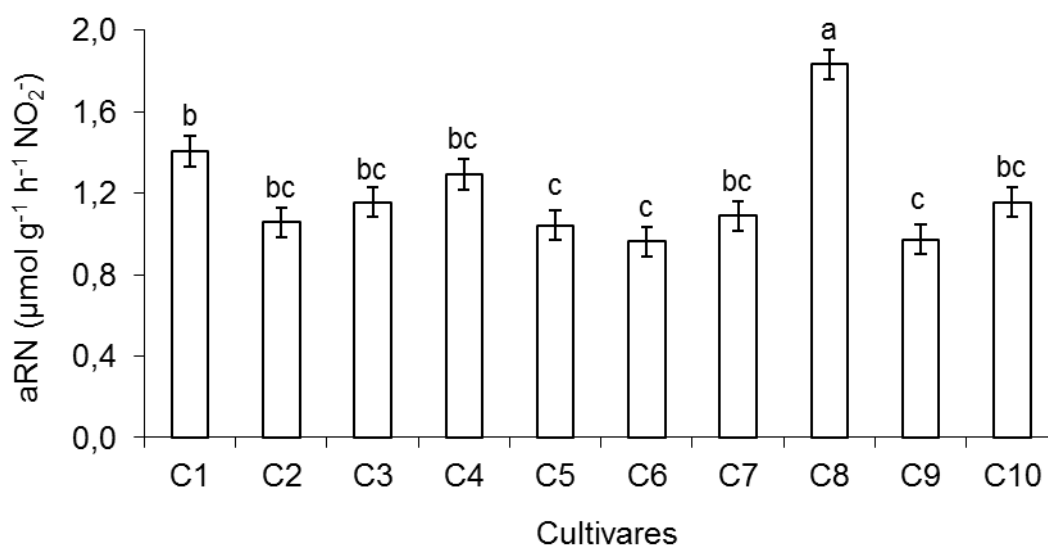


Figura 5. Atividade da redutase do nitrato nas folhas de diferentes genótipos de cana-de-açúcar cultivados em casa de vegetação. C1 = SP81-3250, C2 = PO88-62, C3 = RB855156, C4 = IACSP95-5000, C5 = SP80-3280, C6 = RB72454, C7 = IACSP93-3046, C8 = IACSP95-3028, C9 = RB867515, C10 = IAC87-3396. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Ao comparar estatisticamente, as médias das alturas atingidas pelos diferentes genótipos, notou-se que, as cultivares C3, C5 e C6 se destacaram em

relação às outras. Atingiram altura de até 37,3 cm (SP80-3280) (Figura 6). Enquanto isso, dentre as cultivares que se mostraram de crescimento intermediário (C1 e C8), a maior altura foi de 29,1 cm. A cultivar que menos cresceu foi a IACSP93-3046 (C7), a qual apresentou 24,1 cm de altura.

De modo geral, as cultivares diferenciaram entre si no acúmulo de massa seca na parte aérea (MSPA). Observou-se pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) que as cultivares SP80-3280, RB72454 e RB855156 foram as que mais incrementaram a MSPA, atingindo valores de 8,0; 8,2 e 7,2 g, respectivamente (Figura 7). Estas cultivares estão entre as 15 mais plantadas do Brasil (CHAPOLA et al., 2013). As que estatisticamente menos apresentaram valores médios de MSPA foram as cultivares C7, C8, C10 e C2, com médias entre 4,9 e 5,10 g. De modo geral, cultivares que apresentaram maiores MSPA também apresentaram maiores alturas (C5, C6 e C7). As cultivares que apresentaram menores MSPA também apresentaram menores alturas (C7 e C10).

Os valores de massa seca de toletes, no momento da coleta, apresentaram diferença significativa pelo teste F, dependendo então da cultivar ($F = 2,85^*$, $CV = 19,99\%$). Com isso, não foram incluídos na massa seca de sistema radicular (MSSR), conforme no capítulo anterior. Portanto, as análises estatísticas foram realizadas separadamente, para a massa seca de raiz (MSR) e massa seca de toletes, apenas. Os toletes, antes da germinação, são comparados visualmente na Figura 1. As cultivares que mais acumularam MSR foram as SP80-3280 (C5) e a RB72454 (C6), ressalta-se que também foram as que apresentaram aRN em menores níveis (Figura 5), e ainda, as maiores alturas (Figura 6). Os valores médios de acúmulos de raiz observados foram de 3,11 e 3,13 g, respectivamente. Entretanto, estes acúmulos não diferiram estatisticamente dos acúmulos observados nas cultivares C1 e C3. Os menores valores de biomassa seca de raiz foram observados nas demais cultivares, com valores que variaram de 1,61 a 2,15 g (Figura 7).

A diferença produtiva entre genótipos de cana-de-açúcar cultivados em campo não é novidade (OLIVEIRA et al., 2010; FERREIRA JUNIOR et al., 2012). Em casa de vegetação, não é diferente. No estudo de Donato et al. (2003), que avaliaram seis cultivares de cana-de-açúcar sob doses de nitrogênio, notaram-se

diferenças significativas entre as cultivares no acúmulo de biomassa, sendo que, uma delas, a Co 997, apresentou o maior ganho e teve como consequência, a maior quantidade de N acumulado em aminoácidos livres em relação às demais cultivares, sugerindo maior eficiência no processo de assimilação.

Foi observado que, em condições controladas, a cultivar RB867515, a mais cultivada no Brasil (CHAPOLA et al., 2013), apresentou altura e MSPA inferior a RB72454. Em condições de campo, geralmente, se observa maior produção de colmos na cultivar RB867515 em relação à RB72454 (FERREIRA JUNIOR et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Em outro estudo, Oliveira et al. (2010) observaram produção de colmos na cultivar SP81-3250, que foi intermediária no presente estudo, maior que nas RB867515 e RB72454, que apresentaram produções iguais. Estas diferenças indicam que, o acúmulo de biomassa na fase inicial não é sinônimo de maior produtividade de colmos, e que pesquisas de comparação de genótipos quanto à produtividade devem, de preferência, ser realizadas em ambientes de campo. Porém, neste estudo, priorizou-se a estimativa da atividade da RN e as variáveis produtivas foram mensuradas, principalmente, para testar as relações com a enzima.

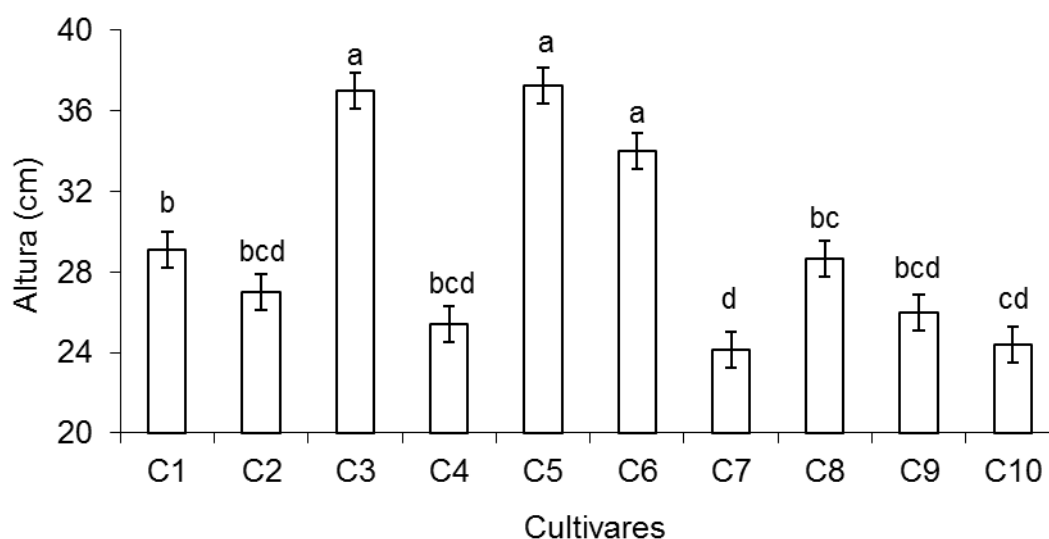


Figura 6. Altura de diferentes genótipos de cana-de-açúcar cultivados em casa de vegetação. C1 = SP81-3250, C2 = PO88-62, C3 = RB855156, C4 = IACSP95-5000, C5 = SP80-3280, C6 = RB72454, C7 = IACSP93-3046, C8 = IACSP95-3028, C9 = RB867515, C10 = IAC87-3396. Barras

seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

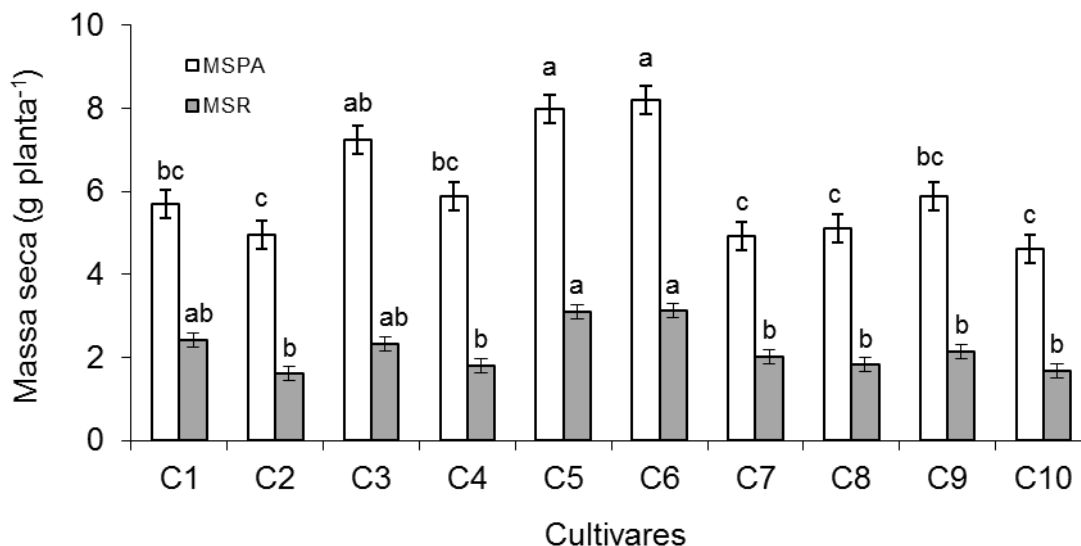


Figura 7. Massa seca de diferentes genótipos de cana-de-açúcar cultivados em casa de vegetação. C1 = SP81-3250, C2 = PO88-62, C3 = RB855156, C4 = IACSP95-5000, C5 = SP80-3280, C6 = RB72454, C7 = IACSP93-3046, C8 = IACSP95-3028, C9 = RB867515, C10 = IAC87-3396. MSPA = massa seca da parte aérea, MSR = massa seca de raiz. Barras seguidas de mesma letra em cada variável não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A cultivar que apresentou o maior teor de N nos tecidos da parte aérea foi a IAC87-3396 (12,91 g kg⁻¹). Porém, este teor não diferenciou estatisticamente dos teores observados nas cultivares C8 (IACSP95-3028), C7, C1, C2 (PO88-62) e C3 (Figura 8). Os menores teores de N foram observados nas cultivares C4, C5, C6 e C9, e variaram de 11,01 a 11,54 g kg⁻¹. No estudo de Pereira et al. (2013), em nível de campo, a cultivar C9 apresentou maior teor de N que a cultivar C6. A cultivar C6 (RB72454), além de inferioridade no teor de N nos tecidos, foi também a que apresentou menor aRN (Figura 5). Esta cultivar é a 9º mais cultivada no Brasil (CHAPOLA et al., 2013).

As cultivares C6, C5 e C3 foram as que mais acumularam N na parte aérea (Figura 9). Estas plantas, foram capazes de extrair do meio de cultivo 91,5; 92 e 86,5 mg de N aplicado na forma de uréia (200 mg de N), ou seja, apresentaram eficiência de recuperação do fertilizante de 45,8; 46 e 43,3%, respectivamente. Entretanto, é

possível que parte deste N acumulado tenha sido proveniente do próprio tolete ou FBN (BASTO; CAZETTA; PRADO, 2010). O restante das cultivares apresentaram acúmulo de N, inferior estatisticamente, a estas cultivares. Contudo, não diferiram entre si. Estes menores acúmulos variaram de 58,5 a 68,5 mg de N na parte aérea.

O maior acúmulo foi devido ao maior incremento de MSPA observado nestas cultivares (Figura 7), o que indica alta exigência destas cultivares a N. Por outro lado, apresentaram altas respostas produtivas a N. Além da parte aérea, estas cultivares foram umas das que mais incrementaram raiz e também, as que atingiram maiores alturas (Figura 6), entretanto, foram umas das que atingiram menores atividades da RN (Figura 5).

As cultivares SP81-3250 e RB867515 extraíram do solo mais N que a RB72454, o contrário foi observado por Oliveira et al. (2010). No estudo de Pereira et al. (2013) a cultivar RB867515 também apresentou maior acúmulo de N que a RB72454.

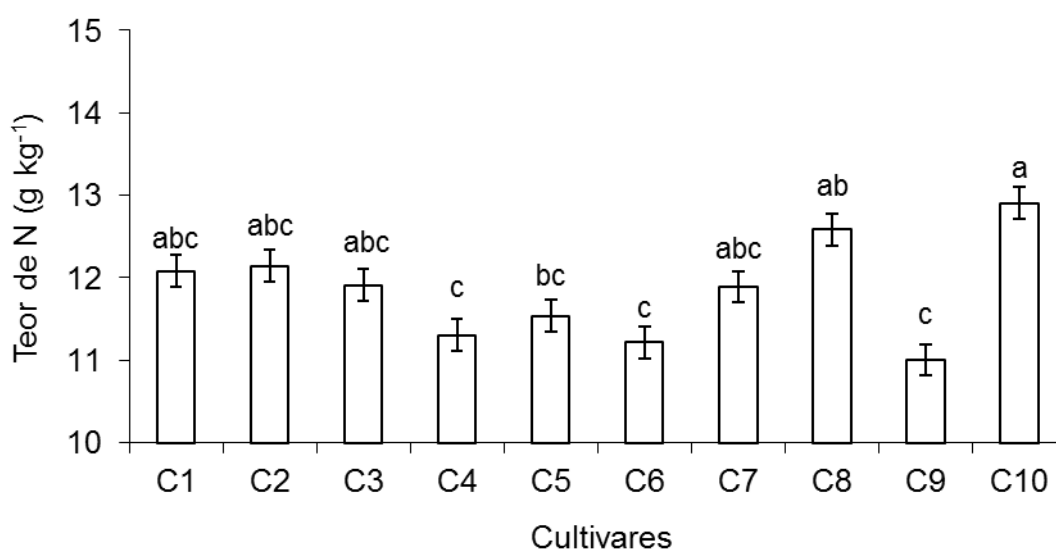


Figura 8. Teor de nitrogênio nas partes aéreas de diferentes genótipos de cana-de-açúcar cultivados em casa de vegetação. C1 = SP81-3250, C2 = PO88-62, C3 = RB855156, C4 = IACSP95-5000, C5 = SP80-3280, C6 = RB72454, C7 = IACSP93-3046, C8 = IACSP95-3028, C9 = RB867515, C10 = IAC87-3396. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

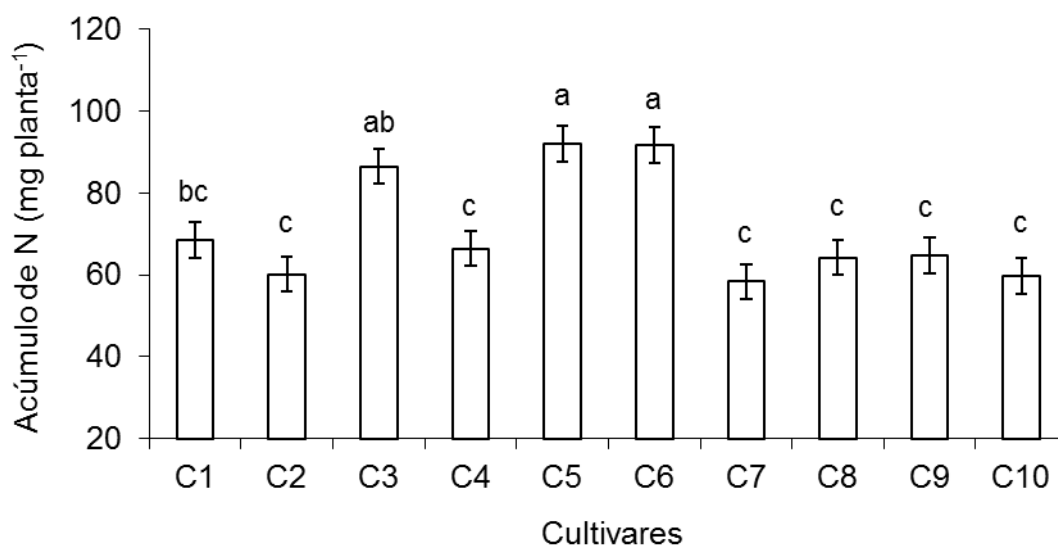


Figura 9. Acúmulo de nitrogênio nas partes aéreas de diferentes genótipos de cana-de-açúcar cultivados em casa de vegetação. C1 = SP81-3250, C2 = PO88-62, C3 = RB855156, C4 = IACSP95-5000, C5 = SP80-3280, C6 = RB72454, C7 = IACSP93-3046, C8 = IACSP95-3028, C9 = RB867515, C10 = IAC87-3396. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A cultivar que apresentou a maior capacidade de converter em biomassa total o nitrogênio absorvido (EU) foi RB72454 (C6), porém esta não diferiu estatisticamente das cultivares C3 (RB855156) e C5 (SP80-3280) (Figura 10). Em estudo com cultivares da gramínea “Kentucky bluegrass”, Jiang, Sullivan e Hull (2000) também observaram que a eficiência de uso do N variou em função do genótipo avaliado.

Os mecanismos fisiológicos associados com a EU são principalmente a atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio, cuja atividade da RN pode ser o processo limitante do potencial de assimilação de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2013). Vários autores determinaram e/ou citaram valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) para a RN em diversas espécies (CHEN et al., 2004; BOBADE; KHYADE, 2012). Estes autores mostraram que a afinidade da enzima RN pelo nitrato pode variar de acordo com as espécies ou mesmo cultivares de plantas. Com isso, as variações observadas no presente estudo podem estar associadas às diferenças genotípicas entre as cultivares. No estudo de Justino et al. (2006), os autores estimaram as constantes cinéticas de absorção de nitrato para duas cultivares de

arroz e observaram que, além das diferenças causadas pela afinidade da RN pelo nitrato absorvido, os genótipos também diferiram quanto a afinidade do sistema de absorção de nitrato, que pode controlar a EU pela eficiência dos transportadores, e ainda, que íons como o Al^{+3} poderiam modificar a afinidade do sítio de ligação pelo nitrato, pelo efeito na configuração da proteína transportadora.

Apesar de muitos estudos sugerirem que a redução do nitrato catalisada pela RN se constitui na etapa limitante do uso de N, e consequente produtividade, existem revisões como a de Bredemeier e Mundstock (2000), comentando que o metabolismo do N é multi-regulado e integrado ao metabolismo geral da planta, e ainda, que é complexa a identificação de pontos metabólicos específicos limitantes para o incremento da produtividade. Talvez por isso, no presente trabalho, a maior atividade da RN não tenha sido observada no genótipo mais eficiente em utilizar N. Além de que, é possível que uma cultivar tenha apresentado maior dependência da RN, que outra, para acumular N, devido, aos toletes para a produção das mudas, terem sido provenientes de cana-de-açúcar com idades desconhecida, mas provavelmente diferentes. Portanto, a taxa e a quantidade de nitrogênio absorvido e assimilado durante o ciclo da planta, depende, além da presença de carregadores específicos na membrana plasmática e da atividade das enzimas envolvidas no seu ciclo, de outros fatores, que podem estar ligados à disponibilidade de energia necessária para os processos de absorção e assimilação, ou do estágio de desenvolvimento da planta (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000), fatores estes que podem se diferenciar dependendo do genótipo.

As cultivares não diferiram entre si quanto à eficiência de absorção de nitrogênio (Figura 11), ou seja, a capacidade das raízes extraírem N do meio de cultivo foi a mesma para todos os genótipos testados. Considerando a observação de diferença estatística entre a biomassa seca de raiz das cultivares (Figura 7), é possível deduzir que o influxo de N foi por mecanismos diferentes. Segundo Rozane et al. (2007) algumas espécies se diferenciam na absorção produzindo extenso sistema radicular, enquanto outras têm alta taxa de absorção por unidade de comprimento de raiz, o que provavelmente também acontece entre diferentes genótipos de uma mesma espécie.

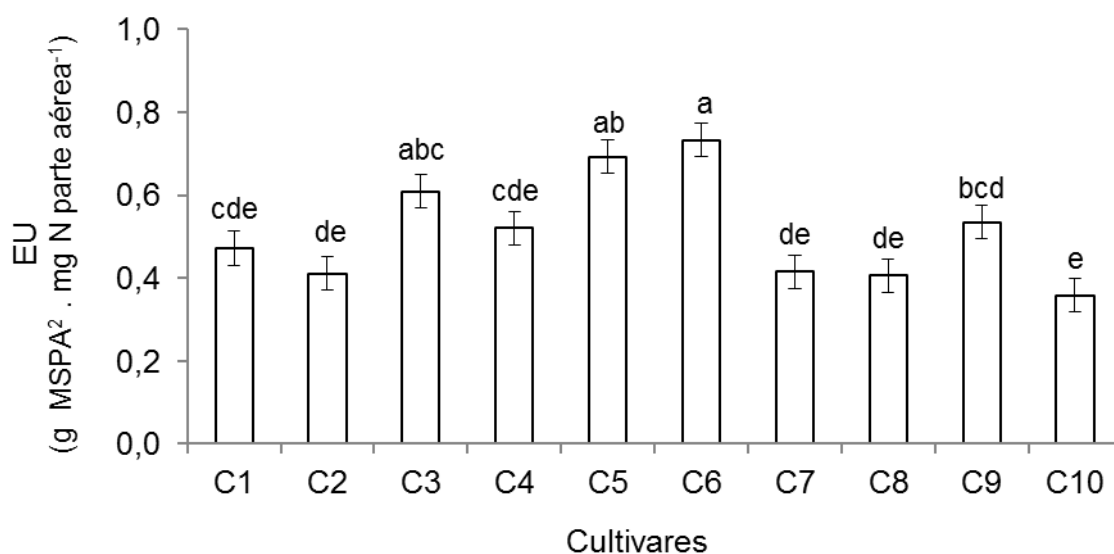


Figura 10. Eficiência de utilização de N em diferentes genótipos de cana-de-açúcar cultivados em casa de vegetação. C1 = SP81-3250, C2 = PO88-62, C3 = RB855156, C4 = IACSP95-5000, C5 = SP80-3280, C6 = RB72454, C7 = IACSP93-3046, C8 = IACSP95-3028, C9 = RB867515, C10 = IAC87-3396. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade



Figura 11. Eficiência de absorção N em diferentes genótipos de cana-de-açúcar cultivados em casa de vegetação. C1 = SP81-3250, C2 = PO88-62, C3 = RB855156, C4 = IACSP95-5000, C5 = SP80-3280, C6 = RB72454, C7 = IACSP93-3046, C8 = IACSP95-3028, C9 = RB867515, C10 = IAC87-3396. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A aplicação do teste de correlação de Pearson, neste experimento de casa de vegetação, foi realizada com 40 observações em cada variável. Ressalta-se que, este conjunto de observações foi proveniente de 10 cultivares diferentes (4 repetições por cultivar). Portanto, o fator “genótipo”, foi o único que variou, ou seja, que não pôde ser controlado. Com isso, sempre que for citada na descrição dos resultados a existência ou não de correlação, ou o grau e direção, deve-se interpretar que o determinado comportamento se sucedeu independente do genótipo avaliado.

Quanto as relações entre as possíveis combinações binárias das variáveis aRN, altura, MSPA, MSR, teor de N, acúmulo de N, EU e EAB, os resultados apontaram a ausência de correlação entre a maioria (Tabela 2) mas, correlações significativas importantes também foram observadas, indicando estatisticamente a dependência de algumas variáveis.

A aRN apresentou correlações apenas com as variáveis MSPA (fraca e negativa), teor de N (moderada e positiva) e EU (moderada e negativa) (Tabela 2).

Diferente dos resultados do atual trabalho, Lavres Junior, Santos Junior e Monteiro (2010) observaram que a relação entre a aRN e a matéria seca de parte aérea de dois cortes de capim Mombaça, apresentou relação positiva com coeficiente de correlação de 0,65. Donato et al. (2004), não analisaram a relação entre as variáveis mas, relataram que a cultivar de cana-de-açúcar que apresentou a maior matéria fresca foi também a que mostrou a maior aRN. No artigo de Reis, Furlani Junior e Haga (2007), os autores observaram relação com um coeficiente de correlação de 0,89 entre a atividade da enzima e a produtividade de grãos de café. Além disso, também observaram que a atividade da enzima correlacionou-se positivamente com o teor de N foliar ($R = 0,96$) (REIS; FURLANI JUNIOR; HAGA, 2007). A aRN geralmente se associa com a produtividade dos vegetais devido ao papel regulador da disponibilidade de N reduzido para o metabolismo das plantas. A observação de correlação negativa, neste aspecto, pode estar ligada às diferenças genótípicas entre as cultivares, o que corrobora os resultados de Purcino et al. (1994), que observaram que os aumentos de produtividade de milho, causados pela adubação nitrogenada, não foram acompanhados por aumentos na atividade da RN, o que foi atribuído as diferenças genótípicas.

A direção da relação observada da aRN com a EU (negativa), pode ter ocorrido pela concentração de nitrato no ambiente induzindo a síntese da enzima, e de forma geral, quanto maior o nível de N no solo, menor é a eficiência de utilização pelas plantas, como discutido no estudo de Jiang e Hull (1998), que observaram correlações negativas fortes da aRN de folhas da gramínea “Kentucky bluegrass” e EU. Os resultados de Oliveira et al. (2013) foram muito similares ao do presente trabalho, pois também observaram correlações negativas e moderadas, da atividade da RN com a EU, contudo também observaram associação entre aRN e EAB, o que não foi observado no presente estudo.

Correlações moderadas e negativas foram observadas entre o teor de N e as variáveis MSPA e a MSR, contrariando os achados de Ishikawa et al. (2009), que realizaram dois experimentos de campo com cana-de-açúcar adubadas com dois níveis de N, e observaram correlações significativas, nos dois anos, entre a produção de biomassa e o acúmulo de N com coeficientes de correlação de 0,82 e 0,93. De forma semelhante, Prado e Pancelli (2008) observaram relação do teor foliar de N na folha do tipo +3 e a produtividade de colmos da segunda soqueira aos quatro meses após o corte, com coeficientes de correlação de 0,71. A direção oposta da correlação observada no atual estudo, em comparação aos de Prado e Pancelli (2008) e Ishikawa et al. (2009), pode estar associada as diferenças genéticas entre as cultivares, uma vez que estes autores estudaram um único genótipo.

Por outro lado, correlações fortes e positivas foram notadas entre a altura e as variáveis MSPA e acúmulo de N. A MSR correlacionou-se positivamente (graus fortes) com a MSPA e o acúmulo de N, e, em grau moderado com a altura.

Tais resultados são contrastantes com aqueles obtidos por Ishikawa et al. (2009), que observaram baixa associação entre o teor de N com o acúmulo de N. No mesmo trabalho, notou-se no segundo ano, correlação negativa ($R = -0,47$) entre a produção de biomassa e o teor de N foliar.

Observou-se ainda, correlação moderada negativa da EAB com a MSR (Tabela 2). No presente estudo, a EU se correlacionou negativamente com o teor de N (em grau moderado). Em plantas da gramínea “Kentucky bluegrass”, a EU correlacionou-se negativamente com o teor de NO_3^- absorvido, porém não foi

analisado o nitrogênio total nos tecidos da gramínea (JIANG; HULL, 1998). A EU se associou também com a altura de plantas, MSPA, MSR e acúmulo de N (direção positiva e com grau forte).

Tabela 2 - Coeficientes de correlação (R), e suas significâncias, entre as variáveis: atividade da redutase do nitrato (aRN), altura das plantas, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular, (MSR), Teor de N na parte aérea, acúmulo de N na parte aérea, eficiência no uso de N (EU), eficiência de absorção de N (EAB), avaliadas em dez cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em casa de vegetação

Variáveis	Altura	MSPA	MSR	Teor de N	Acúmulo de N	EU	EAB
aRN	-0,10 ^{ns}	-0,31*	-0,23 ^{ns}	0,47**	-0,20 ^{ns}	-0,38*	0,06 ^{ns}
Altura	1,00	0,81**	0,66**	-0,21 ^{ns}	0,83**	0,75**	-0,07 ^{ns}
MSPA		1,00	0,79**	-0,48*	0,97**	0,98**	-0,08 ^{ns}
MSR			1,00	-0,35*	0,76**	0,78**	-0,64**
Teor de N				1,00	-0,24 ^{ns}	-0,64**	0,23 ^{ns}
Acúmulo de N					1,00	0,89**	-0,01 ^{ns}
EU						1,00	-0,14 ^{ns}
EAB							1,00

^{ns}, **, * = não significativo e significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade pelo teste t, respectivamente

4.3.2 Experimento 2: Estudo de correlação entre as variáveis obtidas de plantas de cana-de-açúcar de canaviais comerciais

A aplicação do teste de correlação de Pearson nos dados oriundos do campo foi realizada com 40 observações em cada variável. Este conjunto de observações foi proveniente de canaviais aleatórios, tendo então, o objetivo de analisar dados gerados com a interferência de muitos fatores desconhecidos. Portanto, sempre que for citada na descrição dos resultados, a existência ou não de correlação, ou o grau e direção, deve-se interpretar que, o determinado comportamento aconteceu independente das condições avaliadas.

Observaram-se, de modo geral, atividades da RN que variaram de 0,25 a 2,1 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- , média de 0,75 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- (Figura 12). Porém, esta faixa observada não pôde ser interpretada com finalidade de se diagnosticar o

estado nutricional das plantas, tal como acontece com as interpretações das faixas de teores de nutrientes em folhas, pois o estabelecimento de faixas de atividade enzimática adequada não é praticável, e isto, devido a alta sensibilidade das enzimas a fatores ambientais (NELSON; COX, 2004).

Os teores de nitrogênio observados na folha +1 de cana-de-açúcar coletadas nos canaviais comerciais de Jaboticabal-SP, nas condições do presente estudo, variaram de 12,9 a 25,44 g kg⁻¹ de tecido seco foliar, sendo que, a média foi de 17,95 g kg⁻¹ (Figura 12). Sendo assim, as determinações foram comparadas à faixa de teores de N descrita por Raij e Cantarella (1997) como adequada (18 a 25 g kg⁻¹). Os resultados mostraram que dos 40 canaviais amostrados, 19 estavam bem nutridos quanto à nitrogênio, o restante estavam abaixo do limite inferior da faixa de suficiência. Por outro lado, não se pode afirmar isto, pois os autores da referida publicação, recomendam a amostragem de folhas de plantas de cana no período de maior desenvolvimento da cultura, e no presente estudo não se conhecia o estágio fenológico das plantas.

Em um estudo também realizado com coletas de campo Gallo, Hiroce e Alvarez (1968) avaliaram 44 talhões das principais usinas do estado de São Paulo e observaram valores que variaram de 10,8 a 26,8 g kg⁻¹ na folha do tipo +3, sendo que, segundo Malavolta (2006), os teores adequados de N neste tipo de folha são de 19 a 21 g kg⁻¹, portanto na ocasião, notaram-se canaviais que provavelmente estavam deficientes em N. Prado e Pancelli (2008), também em estudo no município de Jaboticabal-SP, observaram com o uso de doses até 200 kg ha⁻¹ de N, teores que variaram de 15,2 a 18,2 g kg⁻¹ de N na folha do tipo +3 no segundo e no terceiro corte, sendo que as plantas do terceiro corte tenderam a apresentar valores mais baixos. Nas observações de Amaral e Molin (2011), que avaliaram plantas de cana-de-açúcar de diferentes idades e sob doses de N, em dois locais no município de Ribeirão Preto, os teores de nitrogênio nas folhas do tipo +1 variaram de 19,12 a 26,69 g kg⁻¹, ou seja, adequados segundo Raij e Cantarella (1997). Faroni et al. (2009) avaliaram experimentos em três municípios do estado de São Paulo; Pirassununga, Jaboticabal e Pradópolis, usando adubações que variaram desde o nível zero até 120 kg ha⁻¹ de N e observaram teores de N nas folhas do tipo +1 de 19,2 a 20,6 g kg⁻¹.

Ao se associar as variáveis aRN e teor de N foliar pela correlação de Pearson, mesmo com a infinidade de fatores interferentes nestas variáveis, notou-se relação linear positiva com coeficiente (R) de 0,75 (Figura 12), com isso, o grau de associação linear entre as duas variáveis foi classificado como forte. Este resultado, também observado no experimento 1 deste capítulo, indica que é possível o uso da atividade da enzima RN como indicativo do estado nutricional, em nitrogênio, para cana-de-açúcar, contudo, não se tem condições, ainda, de estabelecimento de critérios para aplicação no campo.

Existem relatos, como o de Silva (1989), que ao aplicar doses de N em solo cultivado com cana-de-açúcar, não se observa correlações significativas da aRN com o teor de N foliar. Contudo, Reis, Furlani Junior e Haga (2007), assim como no presente estudo, também observaram correlação positiva ($R = 0,96$) da atividade da enzima com o teor de N foliar, porém, em plantas de café. Os diferentes resultados sugerem uma dependência genotípica e ambiental para a associação entre estas variáveis.

Com isso, ainda existe a necessidade de muitos estudos, em virtude dos diversos fatores que regulam sua atividade, para que a atividade da RN possa servir como uma ferramenta complementar que auxilie na recomendação de fertilizantes nitrogenados.

Obstáculos dessa natureza já foram encontrados por Gallo, Hiroce e Alvarez (1968) ao avaliarem os teores de nutrientes nas folhas de cana-de-açúcar cultivadas em todo o estado de São Paulo, no entanto, devido a pesquisas desenvolvidas após esse período, atualmente é indicada a análise foliar como forma complementar às recomendações de nitrogênio para a cultura (RAIJ, 2011).

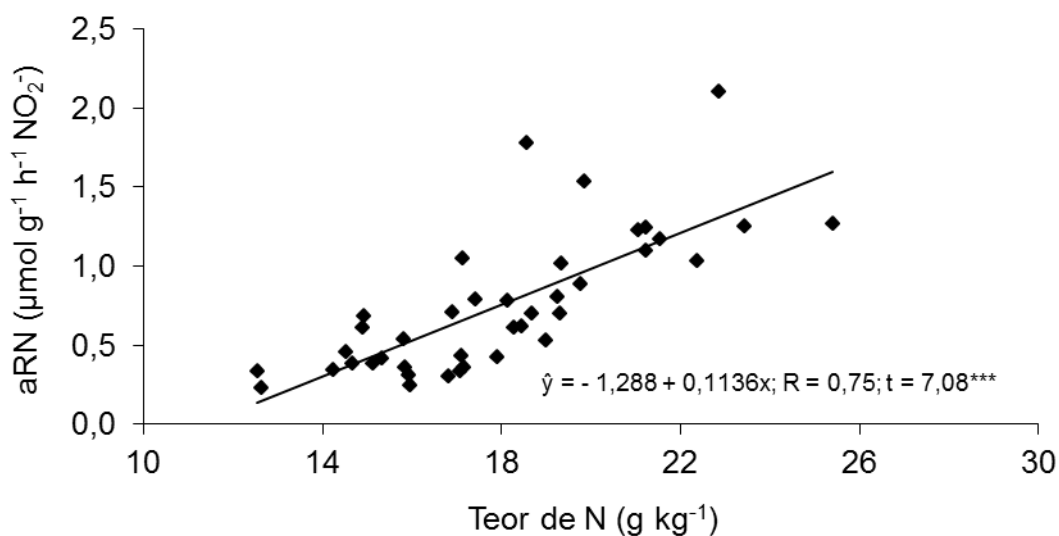


Figura 12. Relação entre a aRN (folha 0) e teor total de N (folha +1), determinados em folhas de cana-de-açúcar oriundas de 40 canaviais comerciais em Jaboticabal-SP. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade pelo teste de correlação de Pearson

No momento das avaliações e coletas das amostras no campo, as plantas de cana-de-açúcar apresentavam alturas de 0,2 a 3,8 m, sendo que a média foi de 1,5 (Figura 13). Estas alturas podem estar mais relacionadas com as idades das plantas, pois provavelmente plantas novas são menores, e com o genótipo, do que com a nutrição do talhão, uma vez que, de modo geral, os produtores da região fazem aplicação de N logo após o corte, o que pode fazer com que o crescimento das plantas não seja limitado por escassez de nitrogênio.

Observou-se uma correlação linear negativa entre a aRN e a altura das plantas (Figura 13). A magnitude do coeficiente ($R = -0,58$) pôde ser interpretada como moderada. Em estudos anteriores, já havia sido relatada a diminuição da atividade da RN em tecidos foliares de cana-de-açúcar à medida que as plantas cresciam (SILVA, 1989; SILVEIRA; CROCOMO, 1990), o que pode estar relacionado tanto a fatores climáticos, como às próprias alterações na atividade metabólica em função do estágio fenológico o qual as plantas se encontram e ao genótipo, uma vez que este fator era desconhecido no presente estudo.

O teor de N na folha +1 foi moderadamente ($R = -0,53$) correlacionado com a altura das plantas (Figura 14). Esta correlação negativa, além de com os fatores

comentados, pode estar associada ao efeito de diluição do nutriente, que pode ocorrer à medida que as plantas aumentam a biomassa, o que também, provavelmente acontece em função do aumento da altura de plantas.

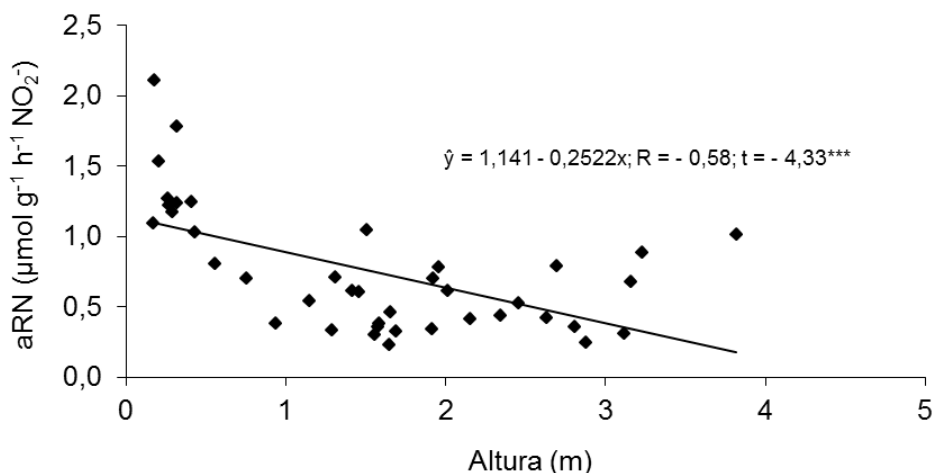


Figura 13. Relação entre a aRN, em folhas do tipo 0, e altura de plantas de cana-de-açúcar tomadas em 40 canaviais comerciais em Jaboticabal-SP. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade pelo teste de correlação de Pearson

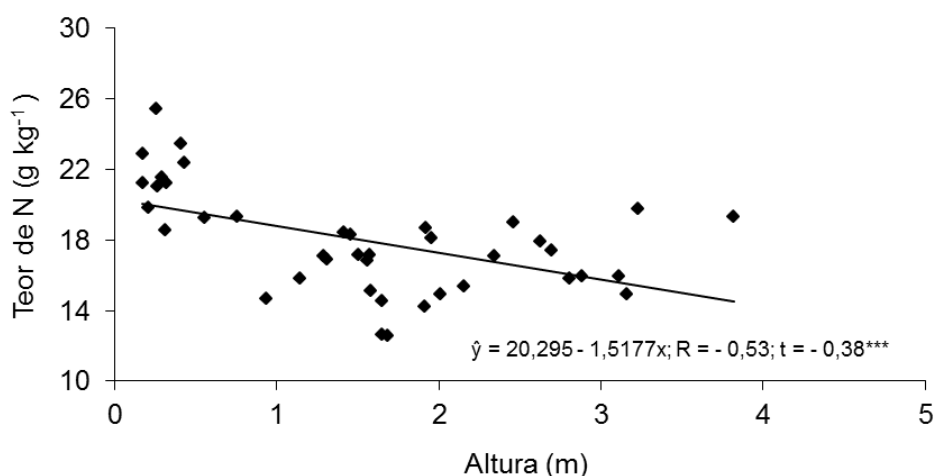


Figura 14. Relação entre o teor de N total (folha +1) e altura de plantas de cana-de-açúcar tomadas em 40 canaviais comerciais em Jaboticabal-SP. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade pelo teste de correlação de Pearson

Os teores de nitrato observados nos canaviais comerciais de Jaboticabal-SP, nas condições do presente estudo, variaram de 0,37 a 0,88 mg g⁻¹ de tecido seco

foliar, sendo que a média foi de $0,54 \text{ mg g}^{-1}$. Estes teores são muito baixos comparados ao azevém anual do estudo de Bar-Akiva, Sagiv e Leshem (1970), que observaram teores de $3,2 \text{ mg g}^{-1}$, porém, ressalta-se que este valor foi obtido por cálculo da média do tratamento controle e das médias observadas com as doses de 300, 600 e 1200 kg ha^{-1} de N, níveis estes, muito altos e impraticáveis na agricultura moderna. Em estudo com cana-de-açúcar, Vieira, Trivelin e Megda (2010) observaram teores de 0,64 a $1,24 \text{ mg g}^{-1}$ em função da aplicação de fontes nitrogenadas após 60 a 180 dias da adubação. De forma semelhante, vários autores relataram em seus estudos a baixa concentração de nitrato nos tecidos de cana-de-açúcar (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967; VILLALOBOS; CARVAJAL, 1977; SILVA, 1989; SILVERA; CROCOMO, 1990; ISHIKAWA et al., 2009).

Os resultados do teste de correlação entre o teor de nitrato nas folhas +1 de cana-de-açúcar, e as variáveis aRN, teor de N e altura indicaram que não há a existência de relação linear entre as variáveis, ou seja, as variáveis foram estatisticamente independentes (Figura 15). A ausência de correlações indica que outros fatores exercem influência no crescimento, na assimilação do N e na atividade da RN.

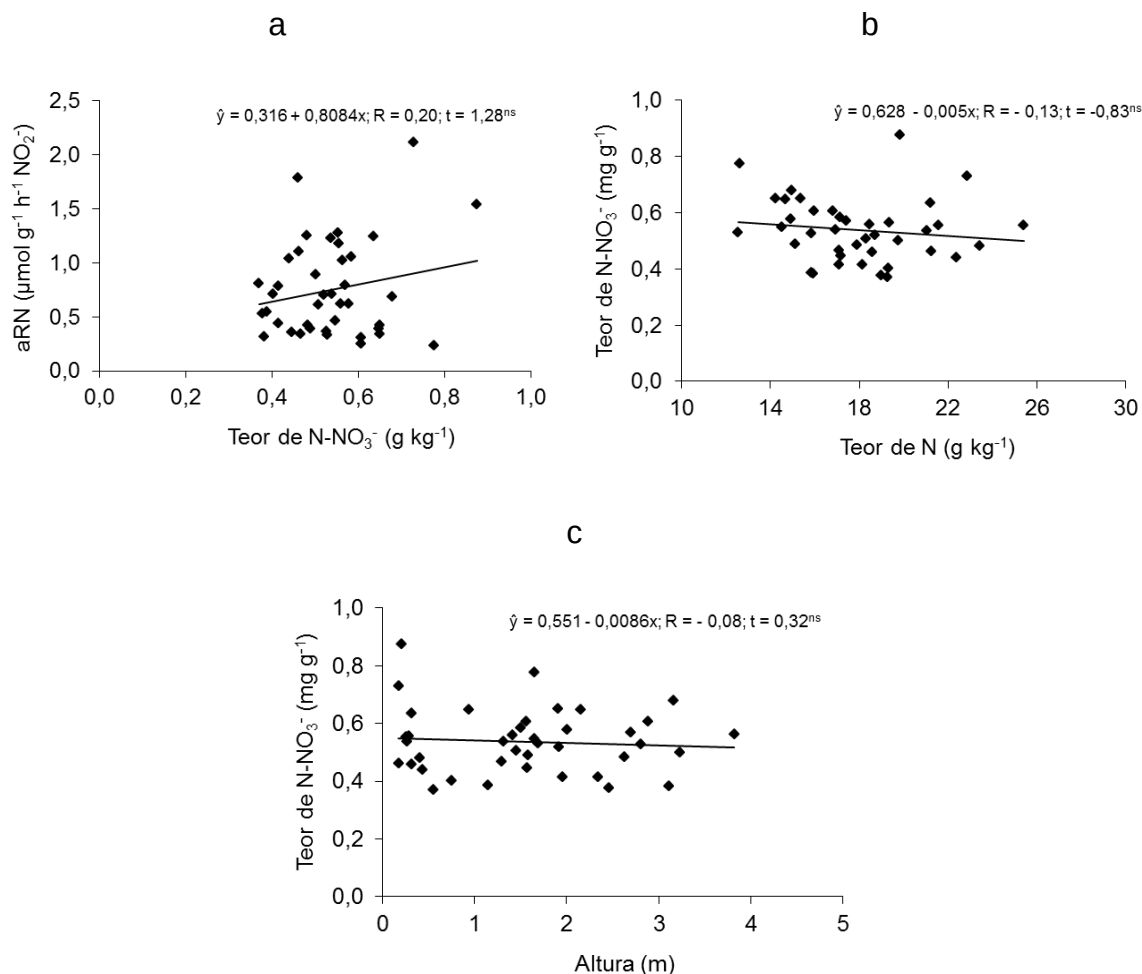


Figura 15. Relação do teor de N-NO₃⁻ na folha +1 com as variáveis aRN na folha 0 (A); teor de N na folha +1 (B) e altura (C) de plantas de cana-de-açúcar oriundas de 40 canaviais comerciais em Jaboticabal-SP. ^{ns} = não significativo pelo teste de correlação de Pearson

Em contrapartida, no estudo de Silva (1989), foi observado associação positiva ($R = 0,79$) da aRN com o teor de nitrato foliar no tratamento o qual foi aplicado 120 kg ha⁻¹ de N, porém, nos demais níveis de N (0 e 240 kg ha⁻¹), de forma semelhante a este estudo, não foram observadas correlações significativas.

Sendo o nitrato o substrato para a atividade da RN, era esperada a existência de correlação entre estas variáveis, o que não aconteceu no presente estudo. Esta observação pode ser explicada pela existência de dois reservatórios de nitrato na célula, cujo um deles, é de rápida duração e está ligado à regulação da síntese da enzima e, o outro, de existência mais longa, ligado ao suprimento de substrato

(SOUZA; STARK; FERNANDES, 2002). Resultados semelhantes foram encontrados, em alguns tratamentos, nas avaliações de Silva (1989).

Em outro estudo, ao serem avaliadas sete cultivares da gramínea “Kentucky bluegrass”, Jiang, Sullivan e Hull (2000) observaram correlação positiva moderada ($R = 0,41$) entre o acúmulo de nitrato e o acúmulo de N total. Porém, na ocasião o teor de nitrato não foi relacionado com teores de N e altura. Entretanto, é possível inferir que, mesmo em condições controladas onde o fator cultivar foi o único a variar, o nitrato não foi fortemente correlacionado com o nitrogênio presente na planta.

4.4 Conclusões

1 - O nível de estimativa da atividade da enzima RN varia com a cultivar de cana-de-açúcar.

2 - Em condições controladas, independente da cultivar de cana-de-açúcar, a atividade da RN correlaciona positivamente com o teor de N na parte aérea e negativamente com a eficiência de utilização de N.

3 - Em canaviais comerciais, localizados na região de maior expressão do setor sucroalcooleiro do país, a atividade da RN em folhas de cana-de-açúcar correlaciona, em direções opostas, com o teor de N foliar e com a altura de plantas, e ainda, a atividade da enzima não se associa com o teor de nitrato foliar.

4.5 Referências

ABAYOMI, Y. A.; ETEJERE, E. O.; FADAYOMI, O. Effect of nitrogen level and water deficit on nitrate reductase activity NRA from leaves of two sugarcane cultivars - Co 957 1001. **Turrialba**, San Jose, v. 38, n. 4, p. 352-358, 1988.

AMARAL, L. R.; MOLIN, J. P. Sensor óptico no auxílio à recomendação de adubação nitrogenada em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1633-1642, 2011.

BAR-AKIVA, A.; SAGIV, J.; LESHEM, J. Nitrate reductase activity as an indicator for assessing the nitrogen requirement of grass crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 405-407, 1970.

BASTO, J. C. H. A. G.; CAZETTA, J. O.; PRADO, R. M. Materiais corretivos e nitrogênio na nutrição e na produção de matéria seca de cana-de-açúcar cultivada em vaso. **Interciência**, Caracas, v. 35, n. 1, p. 55-58, 2010.

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

BINBOL, N. L.; ADEBAYO, A. A.; KWON-NDUNG, E. H. Influence of climatic factors on the growth and yield of sugar cane at Numan, Nigeria. **Climate Research**, Oldendorf, v. 32, n. 3, p. 247-252, 2006.

BOBADE, S. N.; KHYADE, V. B. Influence of inorganic nutrients on the activity of enzyme, nitrate reductase in the leaves of mulberry, *Morus alba* (L) (M-5 variety) **Research Journal of Recent Sciences**, Indore, v. 1, n. 5, p. 14-21, 2012.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 277-303, 1999.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ V., V. H., BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Viçosa, 2007. cap. 7. p. 375-470.

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 of Soil Science and Plant Annals**, New York, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

CHAPOLA, R. G.; CRUZ, J. A. NUNES, I. K. FERNANDES JÚNIOR, A. R. **Censo varietal 2012**. Araras: CCA-UFSCar, 2013. 55 p.

CHEN, B. M.; WANG, Z. H.; LI, S. X.; WANG, G. X.; SONG, H. X.; WANG, X. N. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. **Plant Science**, Limerick, v. 167, n. 3, p. 635-643, 2004.

CRAWFORD, N. M.; KAHN, M. L.; LEUSTEK, T.; LONG, S. R. Nitrogen and sulfur. In: BUCHANAN, W.; GRUÍSSEM, R. JONES, R. **Biochemistry e Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 16. p. 786-849.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, E. S.; FRANÇA, J. G. E.; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, E. S.; FRANÇA, J. G. E. Metabolismo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1373-1379, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

FARONI, C. E.; TRIVELIN, P. C. T.; FRANCO, H. C. J.; VITTI, A. C.; OTTO, R.; CANTARELLA, H. Estado nutricional da cultura de cana-de-açúcar (cana-planta) em experimentos com ^{15}N . **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1919-1927, 2009.

FERREIRA JUNIOR, R. A.; SOUZA, J. L.; LYRA, G. B.; TEODORO, I.; SANTOS, M. A.; PORFIRIO, A. C. S. Crescimento e fotossíntese de cana-de-açúcar em função de variáveis biométricas e meteorológicas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 11, p. 1229-1236, 2012.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r) **Revista Política Hoje**, Recife, v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009.

GALLO, J. R.; HIROCE, R.; ALVAREZ, R. Levantamento do estado nutricional de canaviais de São Paulo pela análise foliar. **Bragantia**, Campinas, v. 27, n. 30, p. 365-382, 1968.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.

ISHIKAWA, S.; ANDO, S.; SAKAIGAICHI, T.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate-N concentration of sugarcane, **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 55, n. 4, p. 485-495, 2009.

JIANG, Z.; HULL, R. J. Interrelationship of nitrate uptake, nitrate reductase and nitrogen use efficiency in selected Kentucky bluegrass cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 6, p. 1623-1632, 1998.

JIANG, Z.; SULLIVAN, W. M.; HULL, R. J. Nitrate uptake and nitrogen use efficiency by Kentucky bluegrass cultivars. **Hortscience**, Alexandria, v. 35, n. 7, p. 1350-1354, 2000.

JOHNSON, C. B.; WHITTINGTON, W. J.; BLACKWOOD, G. C. Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield. **Nature**, London, v. 262, n. 5564, p. 133-134, 1976.

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

KUMAR, S. N.; SINGH, C. P. An analysis of seasonal effects on leaf nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 188, n. 2, p. 133-137, 2002.

LAVRES JUNIOR, J.; SANTOS JUNIOR, J. D. G.; MONTEIRO, F. A. Nitrate reductase activity and spad readings in leaf tissues of guinea grass submitted to nitrogen and potassium rates. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 801-809, 2010.

LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. **Biochemical Journal**, London, v. 415, n. 1, p. 11-19, 2008.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARETZKI, A.; CRUZ, A. D. Nitrate reductase in sugarcane tissues, **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 8, n. 4, p. 605-611, 1967.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Sofia, v. 1, n. 3, p. 386-414, 2012.

MELO, W. J.; MELO, G. M. P.; BERTIPAGLIA, L. M. A.; MELO, V. P. **Experimentação sob condições controladas**. 1 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1998. 82 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. In: _____ (Ed.). **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Worth, 2004. cap. 6. p. 190-237.

OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, R. I.; FREIRE, M. B. G. S.; SIMÕES NETO, D. E.; SILVA, S. A. M. Extração e exportação de nutrientes por variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1343-1352, 2010.

OLIVEIRA, L. E. M.; MAGALHAES, A. C. N. Atividade da redutase do nitrato in vivo em folhas de cana-de-açúcar em função das variações nas condições ensaio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 437-443, 1989.

OLIVEIRA, L. R.; MIRANDA, G. L.; LIMA, R. O.; FRITSCHÉ-NETO, R.; GALVÃO, J. C. C. Eficiência na absorção e utilização de nitrogênio e atividade enzimática em genótipos de milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 3, p. 614-621, 2013.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 2, p. 363-370, 2013.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**, São Paulo: Editora Unesp, 2008. 407 p.

PRADO, R. M.; PANCELLI, M. A. Resposta de soqueiras de cana-de-açúcar à aplicação de nitrogênio em sistema de colheita sem queima. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 951-959, 2008.

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

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. p. 231-244. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2011. 420 p.

REIS, A. R.; FAVARIN, J. L.; GALLO, L. A.; MALAVOLTA, J. E.; MORAES, M. F.; LAVRES JUNIOR, J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 315-324, 2009.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; HAGA, K. I. Atividade da redutase do nitrato em folhas de cafeeiro em função da adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 269-276, 2007.

RÖMHELD, V. Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. In: MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2012. cap. 11. p. 299-312.

ROZANE, D. E.; PRADO, R. M.; FRANCO, C. F.; NATALE, W. Eficiência de absorção, transporte e utilização de macronutrientes por porta-enxertos de caramboleira, cultivados em soluções nutritivas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1020-1026, 2007.

SILVA, E. F. **Efeito da adubação nitrogenada sobre a variação estacional das frações nitrogenadas, atividade da nitrato-redutase, e carboidratos solúveis em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*, cv. NA 56-79), em condições de campo**. 1986. 163 f. Dissertação, (Mestrado em Agronomia-Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, 1986.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de n e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 7-15, 1990.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L M; FERNANDES, M. S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Artware Projetos Culturais, 2002. v. 1. 55 p.

VIEIRA, M. X.; TRIVELIN, P. C. O. MEGDA, M. M. Atividade da enzima redutase do nitrato em cana-de-açúcar. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 8., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 6., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., 2010, Guarapari. **Anais...** Guarapari: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010. 1 CD-ROM.

VILLALOBOS, E.; CARVAJAL, J. F. La actividad de la reductasa del nitrato como guia de la fertilizacion nitrogenada de cinco especies agrícolas. **Revista Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 1, n. 1, p. 57-63, 1977.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETTO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 239-269.

5 CAPÍTULO 5 – Atividade da redutase do nitrato em cana-de-açúcar submetida a doses de nitrogênio e estudo do método da reativação enzimática

RESUMO – A adubação nitrogenada exerce efeito sobre a atividade da redutase do nitrato (RN) em cana-de-açúcar sendo que, a atividade potencial desta enzima em folhas pode ser utilizada como medida da capacidade de assimilação do nitrato, podendo ser utilizada como indicadora do estado nutricional em nitrogênio. O objetivo deste capítulo foi estudar a aplicação de doses de adubo nitrogenado em plantas de cana-de-açúcar deficientes em nitrogênio. Além disso, verificar se o método da “Reativação enzimática” é indicador da nutrição nitrogenada para plantas de cana-de-açúcar. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, usando como substratos dos vasos combinações entre amostra de terra de um Latossolo, areia e vermiculita, com fertilidade devidamente corrigida. Os vasos de 20 dm³ cada, foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, porém as análises estatísticas foram realizadas em blocos. As coletas foram realizadas após 10 a 14 dias da aplicação de níveis crescentes de fertilizante nitrogenado, até a dose de 100 mg dm⁻³ de N na forma de solução de uréia. As variáveis avaliadas foram: atividade da RN, massa seca de parte aérea e de sistema radicular, teor e acúmulo de N na parte aérea, Leituras ICF das folhas 0 e +1, teores de N e de nitrato foliar e altura de plantas, além disso, procedeu-se o estudo para verificar a possibilidade de se empregar um método enzimático para o diagnóstico da nutrição nitrogenada na cultura. Os resultados mostraram que sob moderada deficiência de N, a atividade da enzima RN em plantas de cana-de-açúcar não é alterada, após 12 dias da aplicação de doses acima de 25 mg dm⁻³ de N. Já quando em severa deficiência de N, a atividade da RN é influenciada pela dose de N. A resposta é crescente e linear em doses inferiores a 20 mg dm⁻³ de N. Mostraram ainda, que os comportamentos entre o teor de nitrato, teor de N foliar e leitura ICF em folhas de cana-de-açúcar são equivalentes, já a curva do nitrato é inversa a das outras variáveis. Além disto, constatou-se que os teores de nitrato foliar em cana-de-açúcar são muito baixos, e isto, faz com que não haja observação de atividade da enzima quando sem a adição de nitrato no meio de incubação no momento da análise. A atividade da enzima RN apresenta boas perspectivas para indicar o estado nutricional de plantas de cana-de-açúcar, porém, ainda existe a necessidade do estabelecimento de um critério para o diagnóstico.

Palavras-Chave - *Saccharum* spp., adubação nitrogenada, diagnose nutricional, indicador bioquímico, métodos alternativos.

5.1 Introdução

A quantidade total de fertilizantes nitrogenados usada na cultura da cana-de-açúcar no Brasil é de aproximadamente 613 mil toneladas (ROBINSON et al., 2011), sendo a principal fonte, a uréia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] (OKUMURA; MARIANO, 2012).

O nitrogênio é o nutriente que mais onera o custo de produção da cana-de-açúcar. Além do manejo correto do nutriente na agricultura, por questões econômicas e ambientais, é de suma importância se proceder a recomendação da adubação nitrogenada na medida certa, pois tanto o excesso, como a deficiência, influenciam negativamente na qualidade tecnológica da cana-de-açúcar (VITTI et al., 2008).

As recomendações para fins de adubação nitrogenada da cultura são baseadas em publicações como o boletim técnico de número 100 do IAC (RAIJ et al., 1997). Que recomendam doses em função da extração de N pelo tipo de cultura (cana-planta ou soca) e da produtividade esperada.

A diagnose foliar para fins de recomendação é estudada desde a década de 60 no Brasil (GALLO; HIROCE; ALVAREZ, 1968). Atualmente, é utilizada como complemento à análise química do solo, pois para nitrogênio, não existe um critério confiável para a recomendação da adubação com base apenas na análise do solo, por isso, a diagnose foliar é uma ferramenta muito útil para direcionar a adubação, uma vez que teores foliares podem representar o estado nutricional da planta (MALAVOLTA, 2006). Porém, por limitações na metodologia, ou mesmo, por não representar a fração metabolicamente ativa do nutriente, existe uma série de limitações no uso da diagnose foliar para a avaliação do estado nutricional de plantas (BAR-AKIVA; STERBAUM, 1965; CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010).

A criação de métodos enzimáticos para a indicação do estado nutricional, ou mesmo para a recomendação de N seria muito interessante, pois, geralmente a concentração total é fracamente correlacionada com a disponibilidade do nutriente no ponto de vista fisiológico (RÖMHELD, 2012). Alguns métodos enzimáticos para a indicação do estado nutricional de plantas foram revisados por Lavon e Goldsmith (1999).

A redução do nitrato, realizada por meio da enzima redutase do nitrato (RN), é a etapa limitante no processo de incorporação de N nas plantas (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2012).

Vários trabalhos relatam o uso da atividade da redutase do nitrato (aRN) como parâmetro para diagnóstico do estado nutricional de plantas. Como os de Lemaître et al. (2008) que observaram que plantas de *Arabidopsis thaliana* sob condições limitantes de nitrogênio apresentam baixa atividade da RN, assim como, Villalobos e Carvajal (1977), em estudo com tomate, café e mais duas gramíneas forrageiras. Em capim Mombaça, os resultados de Lavres Junior, Santos Junior e Monteiro (2010) mostraram que o incremento de doses de N causou o aumento da atividade da RN, o mesmo foi observado por Venkatesan e Ganapathy (2004) em plantas de *Camellia sinensis* em dois lugares da Índia, como também em plantas de café (REIS; FURLANI JUNIOR; HAGA, 2007). Entretanto, podem ocorrer condições em que estas respostas não são observadas, como nos estudos de Purcino et al. (1994) e Silva et al. (2011b) com plantas de milho.

Abayomi, Etejere e Fadayomi (1988) estudaram o efeito de níveis de N na atividade da RN em cana-de-açúcar, observando aumentos diretamente proporcionais, aos dois meses após o plantio, o que refletiu em maior produção de colmos. Portanto, é possível que exista uma relação positiva da atividade da RN com a dose de N onde, a adubação nitrogenada exerce efeito sobre a atividade da RN em cana-de-açúcar. Este indicativo foi também constatado por Silveira e Crocomo (1990), que estudaram cana-planta sob altas doses de N e vinhaça, e por Silva (1989), que com sua pesquisa, além do aumento da atividade da enzima com as dose de N, observou correlação significativa da aRN nas folhas de cana-de-açúcar com o teor de N do solo.

Uma forma de se usar a aRN como parâmetro para indicar o estado nutricional de cana-de-açúcar, em nitrogênio, seria o uso da relação denominada de índice do potencial de assimilação do nitrato, dada pela relação: aRN_i/aRN_e , onde: aRN_i é a estimativa da atividade da RN, induzida pela adição do substrato nitrato no meio reacional e, a aRN_e que é a atividade da RN com o substrato nitrato endógeno, ou seja, sem a adição de nitrato (BAR-AKIVA; SAGIV; LESHEM, 1970). Refletindo a reativação da atividade da RN “Reativação enzimática” (BAR-AKIVA; STERBAUM,

1965), com isso, a atividade potencial desta enzima em folhas, pode ser utilizada como medida da capacidade de assimilação do nitrato, possibilitando o uso como indicadora das exigências de nitrogênio, como descrito no trabalho de BAR-ANKIVA; SAGIV; LESHEM, (1970) com plantas da gramínea *Lolium multiflorum* (azevém).

Na ocasião, os autores verificaram que, o resultado desta relação (índice do potencial de assimilação do nitrato) diminui à medida que é aumentada a dose de N, se aproximando de 1 quando a dose de N é muito alta. No mesmo trabalho, a produção máxima foi observada com teores de nitrato de $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ e relação aRNi/aRNe de 1,5. Concluíram que, acima da taxa de 1,5, a produção pode aumentar em resposta ao aumento da dose de fertilizante.

Na Costa Rica, estudos preliminares, em nível de campo, foram realizados com plantas de cana-de-açúcar (VILLALOBOS; CARVAJAL, 1977). Os pesquisadores mencionaram que o valor do índice calculado para as plantas, com três meses de idade, foi o maior dentre outras culturas avaliadas, significando possível deficiência de N pelos baixos teores de nitrato endógeno nos tecidos.

Então, é possível que a atividade da redutase do nitrato possa ser empregada em um método diagnóstico alternativo, para indicar o estado nutricional de plantas de cana-de-açúcar e servir, no futuro, para auxiliar na recomendação do nutriente.

Neste contexto, o objetivo da pesquisa foi estudar a aplicação de doses de fertilizante nitrogenado em plantas de cana-de-açúcar deficientes em nitrogênio. Além disso, verificar se, o método da “Reativação enzimática” é indicador da nutrição nitrogenada para plantas de cana-de-açúcar.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostra de solo)

Instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação (coberta com vidro) na FCAV/UNESP em Jaboticabal, nos meses de setembro e outubro de 2011. Os tratamentos consistiram de cinco níveis de nitrogênio na forma de solução

de uréia (equivalentes a 0, 25, 50, 75 e 100 mg dm⁻³ de N), aplicados via solo no momento em que as plantas começaram a apresentar sintomas visuais de deficiência deste nutriente (45 dias após o transplante).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento, perfazendo um total de 20 unidades experimentais. Cada parcela foi composta por duas plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046.

Para o preparo das mudas (julho a setembro de 2011), os colmos obtidos de um plantio localizado na FCAV/UNESP, foram cortados, deixando-se uma gema por tolete de 5 cm de comprimento. Em seguida, os mini-toletes foram tratados termicamente conforme Copersucar (1989) e a seguir, germinados em copos de 0,5 dm³ preenchidos com areia. Após 32 dias da germinação, estando as plantas com 7 cm de altura (da base até a inserção da folha +1), as mudas consideradas uniformes foram transplantadas para os vasos definitivos, preenchidos com 20 dm³ de terra proveniente de um Latossolo Vermelho eutrófico (EMBRAPA, 2006), com textura argilosa, cujos resultados da análise química esta apresentada na Tabela 1A. O cultivo em substrato composto por amostra de solo foi para representar uma condição real de cultivo, por ocasião da não adubação nitrogenada, ou seja, causar uma situação onde as plantas apresentassem uma condição de deficiência mais amena, além de que, a uréia ficaria mais passível da ação microbiana e enzimática do solo (OKUMURA; MARIANO, 2012).

Tabela 1. Características químicas das amostras dos substratos utilizados no cultivo da cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação

da água de açúcar em condições de base de vegetação									
pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³			-----			%
(a)									
5,0	15	28	1,3	25	10	31	36,3	67,3	54
(b)									
6,5	3	5	0,5	5	64	7	69,5	76,5	91

(A) = substrato composto por amostra de solo usado no experimento 1. (B) =, substrato areia mais vermiculita na proporção de 2:1 (v/v) usado no experimento 2. M.O. = matéria orgânica, SB = soma de bases, T = capacidade de trocas catiônicas, V = saturação por bases.

Com finalidade de se elevar a saturação por bases (V%) a 60, conforme recomendação de Raij e Cantarella (1997) para a cultura da cana-de-açúcar, incorporou-se à massa de amostra de solo peneirada o equivalente a 155 mg dm^{-3} de calcário ($\text{CaO} = 42\%$; $\text{MgO} = 25\%$ e $\text{PRNT} = 131\%$), em seguida colocou-se a massa de amostra de solo em uma caixa de amianto, onde permaneceu úmida por período de 30 dias para que o calcário exercesse seu efeito neutralizador. Após esse período, a terra foi seca naturalmente, peneirada e adubada. Misturou-se o equivalente a 40 e 60 mg dm^{-3} de P_2O_5 e K_2O na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio respectivamente, ressaltando que as doses de N na forma de uréia (fonte nitrogenada mais utilizada nos canaviais brasileiros), só foram aplicadas posteriormente, aos 45 dias após o transplante, estando as folhas basais um pouco cloróticas, sugerindo deficiência de nitrogênio.

Durante a condução do experimento, procedeu-se com frequência a capina manual de eventuais plantas provenientes do banco de sementes do solo. A irrigação foi feita diariamente com base no método de pesagem dos vasos (MELO et al., 1998). Procurou-se manter a umidade a 60% da capacidade de campo. A cada 15 dias era feito o rodízio dos vasos para evitar possíveis influências do ambiente, sendo mantida entre cada vaso, uma distância de cerca de 10 cm. Para evitar a proliferação de lagartas, as plantas eram inspecionadas regularmente e fazia-se a catação manual. Caso apresentassem indícios de presença de ácaros, eram limpas com pano embebido em solução detergente com posterior retirada do excesso com pano encharcado com água.

Coleta e preparo das amostras

Nas épocas das coletas dos experimentos 1 e 2, as idades das plantas (da emergência até a coleta) eram de 87 e 121 dias, respectivamente. Com isso, ressalta-se que as diferenças de idade foram principalmente devido ao tempo para que as plantas começassem a apresentar sintomas de deficiência de nitrogênio, em virtude do esgotamento de cada tipo de substrato e, ao tempo levado para a produção das mudas, uma vez que os toletes, para o preparo das mudas do experimento 1, foram germinados no mês de julho, mês este em que as

temperaturas estavam mais baixas, portanto mais frio, com isto, as mudas demoraram mais tempo para crescer até um tamanho ideal para o transplântio.

A partir do 10º dia após a aplicação das doses de N, momento este em que a aRN é mais alta (resultados prévios descritos no Capítulo 3), procederam-se as coletas. Estas foram realizadas em quatro dias, sendo que cada dia foi considerado um bloco, pois, devido à grande quantidade de amostras, a se analisar, não foi possível coletar tudo de uma só vez.

Em cada dia, foi obtida a média da altura das duas plantas do vaso, tomou-se como medida o comprimento entre o “colo” da planta e o ponto de inserção da folha do tipo +1.

Para avaliar o índice de clorofila total na folha do tipo 0 (zero), foram realizadas 12 leituras para cada vaso. Utilizou-se o medidor eletrônico da marca comercial ClorofiLOG® modelo CFL 1030 (Figura 1). As leituras foram procedidas a partir das 10 horas da manhã. Os valores, fornecidos pelo aparelho, que convencionalmente são expressos em Índice de Clorofila Falker (ICF) (FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA, 2008), foram anotados para posterior análise estatística.



Figura 1. Determinação do índice de clorofila em folha de cana-de-açúcar

A seguir, coletou-se de cada vaso, uma das folhas do tipo 0, encaminhando-a imediatamente para o laboratório, onde foi procedida a análise da aRN. Em seguida, fez-se em uma das plantas, a coleta da folha do tipo +1. Esta folha é considerada diagnóstica, conforme indicação de Raji e Cantarella (1997). Retirou-se a nervura central, secou-a em estufa a 65 °C, por 48 horas. As folhas foram então trituradas

em moinho com câmara de aço inoxidável e, após isso, realizou-se a análise do teor de nitrogênio total conforme Embrapa (2009). Da mesma forma, foi coletada e preparada uma folha do tipo 0, de cada parcela, para a determinação do teor de N-NO_3^- . A análise foi realizada conforme método descrito por Cataldo et al. (1975) com pequenas adaptações conforme descrito a seguir:

Na fase de extração do nitrato, primeiramente, obteve-se amostras foliares, finamente moídas, de 250 mg cada. Estes tecidos desidratados foram oriundos da folha do tipo 0. Em seguida, adicionou-se, por amostra, 2 mL de água deionizada a $\pm 85^\circ\text{C}$, e incubou-se a 60°C em banho maria por 20 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 15 min em centrífuga Fanem Excelsa[®] II, modelo 206 BL, a 2700 rpm. O sobrenadante foi recolhido em um tubo graduado e repetiu-se o procedimento de incubação e centrifugação por mais três vezes, recuperando sempre o sobrenadante. Ao final dos quatro ciclos (banho maria-centrífuga), anotou-se o volume obtido e inseriram-se os tubos em caixa de isopor com gelo, onde permaneceram por 1 h, para a precipitação de proteínas. Ao final do período, centrifugou-se as amostras conforme descrito anteriormente.

Para o preparo da cota de leitura, foram feitos testes preliminares seguindo o método de Cataldo et al. (1975), onde verificou-se leituras de absorbância muito baixas. Com isso, foi necessária a coleta de 80 μL de extrato ao invés de 40 μL , porém, o extrato foi evaporado em estufa a 70°C ($\pm 2,5$ h) com finalidade de concentrar o extrato, pois, 40 μL é o limite volumétrico para que ocorra a reação adequadamente.

Em seguida, adicionou-se a cada alíquota concentrada, 160 μL de solução composta por ácido salicílico 50 g dm^{-3} em H_2SO_4 concentrado. Agitou-se por 10 s, e, após 20 min de repouso, completou-se o volume para 4 mL com NaOH (2 M), por fim, procedeu-se as leituras em espectrofotômetro a 410 nm.

Para calcular a quantidade de nitrato contida nas amostras, fez-se diluição seriada prévia de uma solução padrão de nitrato de sódio (Reagen[®]) ($1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de N-NO_3^-) e, para o preparo da curva padrão obteve-se alíquotas de 40 μL cada, seguindo-se a mesma rotina descrita para as amostras. A curva padrão obtida definiu a equação: $\hat{y} = 0,0093 + 0,1726x$, ($R^2 = 1$), por meio da qual, foram

determinadas as concentrações de nitrato na solução. O teor de nitrato foliar foi calculado com base nesta equação e foi expresso em mg g^{-1} de tecido seco.

Ainda no momento da coleta, fez-se o corte basal das plantas. O material vegetal obtido foi levado para uma estufa de circulação fechada, na qual permaneceu sob a temperatura de 65 °C até os valores ficarem constantes nas pesagens. Após isso, procederam-se as pesagens em balança analítica para a obtenção dos valores de biomassa seca da parte aérea. Em seguida, procedeu-se as determinações do teor total de N na parte aérea (EMBRAPA, 2009). Ressalta-se que para se determinar o teor de N na parte aérea, não foi contabilizada a folha do tipo 0, utilizada de forma destrutiva para a análise da aRN, com isso, as estimativas, tanto de acúmulo de N como também de MSPA, estão sub-estimadas.

Para o cálculo do acúmulo total de N na parte aérea, uma vez em posse dos resultados dos teores de N na folha +1 e no restante da parte aérea, foi estimado o teor do N total na biomassa, ressaltando que, devido a coleta para análise de nitrato e aRN, não se determinou os teores contidos nas folhas do tipo 0, portanto não entrando no cálculo.

Análises para a aplicação do método da “Reativação da Atividade Enzimática” da RN

Para estudar a “Reativação” da atividade da enzima redutase do nitrato (RN), utilizou-se a relação aRNi/aRNe conforme Bar-Akiva, Sagiv e Leshem (1970), cujo resultado representa o índice do potencial de assimilação do nitrato. Onde: aRNi é a estimativa da atividade da RN induzida pela adição do substrato nitrato no meio reacional e, aRNe é atividade da RN com o substrato nitrato endógeno, ou seja, sem a adição de nitrato. Ressalta-se que, ambas as atividades foram estimadas em tecidos foliares originados de uma só folha. Então, nas duas amostras (com e sem NO_3^-), o nível da enzima presente foi o mesmo, pois, os tecidos foram originados da mesma folha.

A aRNi representou toda a capacidade assimilatória do nitrato daquele tecido, naquele instante, pois teve muito substrato em relação a enzima. Já a aRNe representou o nível de nitrato (substrato) presente na folha. Assim, quanto mais

próximo do valor 1 for o resultado da relação $aRNi/aRNe$, significa que maiores quantidades de nitrato estarão presentes nos tecidos, indicando a possível suficiência do íon nas células.

As análises da aRN foram realizadas usando o método previamente padronizado, descrito no Capítulo 2. No momento da coleta de cada parcela, retirou-se as amostras foliares frescas de uma mesma folha do tipo 0 (zero), visando o preparo de três amostras, de 500 mg cada, para análise com meio de incubação na presença de nitrato e outras três, em outro meio ausente de nitrato.

A coleta foi realizada por volta das 13 h sendo, as folhas, levadas imediatamente para o laboratório para o preparo das amostras. Ressalta-se que, devido a pequena quantidade de material vegetal disponível, utilizou-se toda a folha, com exceção da nervura principal. A folha analisada foi a do tipo 0, pois esta, estava maior que a folha do tipo +1. Também não foi possível o corte com furador de rolha, com isso, o tecido foliar foi cortado com tesoura em secções de aproximadamente 0,5 cm. Pesou-se em balança analítica 500 mg de tecido foliar por amostra, sendo estas colocadas em frascos escuros e, devido ao tempo de preparo entre cada amostra, manteve-se os frascos com as amostras dentro de uma caixa de isopor com gelo até a adição do meio de incubação.

Após o preparo de todo material, cada frasco foi preenchido com 10 mL do meio de incubação. O meio destinado às amostras sem a adição de nitrato ($aRNe$) foi composto por 2,5 mL de solução tampão com concentração de 285 mmol dm^{-3} de KH_2PO_4 (Merck®) a pH 7,3; 1,0 mL de Tween 20 (Reagen®) a 0,6% (v/v) e 4 mL de água deionizada. Já no meio para as amostras com a adição de nitrato ($aRNi$), ao invés dos 4 mL de água deionizada, se adicionou 2,5 mL de KNO_3 (Nuclear®) a 300 mmol dm^{-3} e apenas 1,5 mL de água deionizada.

Os frascos foram colocados em um dessecador de vidro e submetidos ao vácuo, com uma pressão negativa de 600 mm Hg por 3 minutos ininterruptos, com posterior reintrodução do ar. Em seguida, os frascos foram transferidos para incubação em banho-maria a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ (± 1), no escuro, durante 90 min. As amostras eram agitadas de 15 em 15 min.

Ao término do tempo de incubação, adicionou-se 1 mL de solução de sulfanilamida a 1% em HCl 3 mol dm^{-3} para interromper a reação. O nitrito produzido

em função da presença da enzima RN foi determinado por uma alíquota de 0,5 mL do meio de incubação. A alíquota foi acrescentada a 0,5 mL de solução composta por sulfanilamida (Vetec[®]) 10 g dm^{-3} em HCl 3 mol dm^{-3} (Merck[®]) e 0,5 mL de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina $0,2 \text{ g dm}^{-3}$ (Sigma[®]). A solução foi homogeneizada e após 20 minutos, diluída a 4 mL com água deionizada, e a absorbância (540 nm) foi medida em espectrofotômetro modelo Spectronic 20D.

Para calcular a quantidade de nitrito contida nas amostras, fez-se uma curva padrão de nitrito como descrito no Capítulo 2. A curva padrão obtida definiu a equação: $\hat{y} = 0,0164 + 0,0551x$, por meio da qual foram determinadas as concentrações de nitrito na solução. A aRN foi calculada com base nesta equação, e foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de NO_2^- .

Análises estatísticas dos dados

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos à análise para a verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Sisvar, ao passo que, a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Cochran ($p > 0,05$) no programa estatístico Saeg. Os dados em que não foram verificadas normalidade, e/ou homogeneidade, foram submetidos às devidas transformações. Em seguida procedeu-se à análise de variância pelo teste F. Quando significativo, aplicou-se a análise de regressão, usando o programa estatístico Sisvar.

5.2.2 Experimento 2: Avaliações em plantas cultivadas em substrato areia mais vermiculita

Instalação e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação entre os meses de janeiro a abril de 2012. Os tratamentos consistiram de seis níveis de nitrogênio (equivalentes a 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg dm^{-3} de N), aplicados via substrato (solução de uréia) quando as plantas começaram a apresentar sintomas visuais de deficiência de nitrogênio. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento, perfazendo um total de 24

unidades experimentais. Cada parcela foi composta por duas plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, crescidas em vaso com 20 dm³ de mistura de areia e vermiculita comercial na proporção de 2:1 (v/v), respectivamente. Os resultados da análise química do substrato estão apresentados na Tabela 1B, mostrada anteriormente. O cultivo em areia e vermiculita teve a intenção de submeter as plantas a uma condição de deficiência severa de N, e ainda, promover um ambiente onde a atuação dos fatores naturais como microbiota e enzimas do solo fosse mínima, o que reduziria sua ação sobre a uréia.

Para a correção da fertilidade, baseou-se nas indicações de Rajj e Cantarella (1997). Foi necessária a incorporação do equivalente a 90 e 50 mg dm⁻³ de P₂O₅ e K₂O, que foi fornecida na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio respectivamente. Ressalta-se que, o nitrogênio só foi aplicado posteriormente, e que o K₂O foi parcelado 2/3 no plantio (50 mg dm⁻³) e 1/3 via solução, aplicado na superfície do substrato (25 mg dm⁻³).

Após o transplante, objetivando fornecer alguns macronutrientes e micronutrientes às plantas, semanalmente, fazia-se a aplicação de solução via substrato contendo pequena quantidade de S, Mg, Ca, Fe, Zn, B, Mn, Cu e Mo conforme Hoagland e Arnon (1950). Aos 30 dias aplicou-se sobre o substrato o restante da dose de K, na forma de solução de KCl (25 mg dm⁻³ de K₂O).

As mudas utilizadas foram produzidas, no período compreendido entre dezembro de 2011 e janeiro de 2012, a partir de mini-toletes (5 cm de comprimento) oriundos da APTA (Pólo Centro Oeste), sendo germinados em copos de 0,5 dm³, preenchidos com areia de granulometria fina. Foram transplantadas para os vasos definitivos aos 35 dias após a germinação, estando as plantas com 6 cm de altura (da base até a inserção da folha +1). Após 86 dias do transplante, as plantas apresentavam sintomas visuais de deficiência de nitrogênio, sendo feita a aplicação via substrato de solução de uréia contendo o equivalente, como especificado na descrição dos tratamentos, as doses de 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg dm⁻³ de N.

Os tratos culturais (irrigação e controle de pragas), assim como as atividades de coleta e preparo das amostras, além das determinações analíticas e procedimentos estatísticos foram semelhantes ao descrito para o experimento 1.

Porém, desta vez, avaliou-se também a biomassa seca de sistema radicular (raiz e tolete remanescente) e teor de clorofila na folha +1.

5.3 Resultados e Discussão

Apenas com a finalidade de entendimento das respostas das plantas aos diferentes substratos utilizados nos dois experimentos, compararam-se as grandezas dos valores médios gerais de cada variável (Tabela 2). Estas comparações não foram testadas estatisticamente. Os resultados estatísticos, alvos do estudo, estão descritos mais abaixo, separadamente, para cada experimento.

Como resultados da pesquisa, primeiramente, as comparações das médias gerais mostraram que no experimento 1, observou-se que todas as variáveis nutricionais e fisiológicas apresentaram valores médios gerais superiores aos constatados no experimento 2 (Tabela 2). As variáveis produtivas praticamente se igualaram, enquanto, apenas o teor de nitrato foliar foi inferior no experimento 1 (Tabela 2).

O valor médio geral da aRN, nas plantas cultivadas no substrato composto por amostra de solo, foi pouco mais que duas vezes superior ao do experimento com areia e vermiculita (Tabela 2). Esta observação, pode ter sido devido ao experimento 1 ter sido coletado em outubro de 2011 (temperatura e luminosidade altas). Por outro lado, o experimento 2 foi coletado em abril de 2012 (temperaturas mais amenas e baixa luminosidade), e é conhecido que, tanto a luz como a temperatura do ar, são fatores reguladores da atividade da enzima (FRESCHI et al., 2009).

Os valores médios gerais de altura e MSPA foram praticamente os mesmos nos dois experimentos (Tabela 2). Quanto as variáveis teor de N na parte aérea, teor de N foliar, acúmulo de N e ICF da folha 0, observou-se que as grandezas foram 40, 35, 23 e 22% superiores no experimento 1, montado com terra (amostra de solo). A média do teor de nitrato foi 15% menor no experimento com amostra de solo em relação ao com areia e vermiculita.

No experimento 1, a média geral da quantidade de N aplicada foi de 500 mg planta⁻¹, entretanto, observou-se que a média de N absorvido foi de 47,57 mg planta⁻¹. Já no experimento 2, a média geral da quantidade de N aplicada no experimento

foi de 258 mg planta⁻¹, contudo, observou-se que a média de N absorvido foi de 36,87 mg planta⁻¹ (Tabela 2), ou seja, de modo geral, as plantas não recuperaram todo o N aplicado.

Em condições de campo, cana-planta requer baixas quantidades de N (VITTI et al., 2008). Por conseguinte, responde pouco a adubação nitrogenada, portanto, as doses testadas para o experimento 1 foram mais que o suficiente para nutrir adequadamente as plantas. Todavia, também é possível que as plantas não tenham recuperado todo o N aplicado devido as perdas por volatilização da amônia (CANTARELLA et al., 2007), ou ainda, pelo curto período desde a aplicação dos tratamentos até o momento das avaliações. Entretanto, os dados da maioria das variáveis sugerem que a partir da dose de 20 mg dm⁻³ de N, as plantas, de modo geral, não respondem a adubação, portanto, seria uma dose adequada, nesta fase inicial, para trabalhos experimentais com a cultura.

Ao se proceder as análises estatísticas das variáveis em função das doses do fertilizante nitrogenado, notou-se que, as respostas foram mais evidentes no experimento com areia e vermiculita, em relação ao experimento com amostra de solo (Tabela 2). Estas observações podem ter sido devido as plantas estarem menos nutridas em N que as do experimento 1, o que é indicado pelos menores teores médios de N e pelo menor ICF (39,45), em relação ao das folhas do experimento 1 (ICF = 50,34) (Tabela 2). Com isto, as plantas do experimento 2 estavam mais necessitadas de N que as do experimento 1, por isso as respostas a doses do fertilizante nitrogenado.

Malavolta (2006) cita que valores entre 40 a 52 obtidos nas condições recomendadas para algumas culturas, com medidor de clorofila SPAD-502[®] estão adequados para gramíneas, contudo, não se refere à cana-de-açúcar. Amaral e Molin (2011) observaram, em diversas condições de campo, medidas que variaram de 42,93 a 47,93, com o uso do SPAD-502[®]. Todavia, no presente trabalho foi utilizado o clorofiLOG[®], segundo Amaral et al. (2010), a associação dos valores obtidos com os dois aparelhos em folhas de cana-de-açúcar é forte, com um coeficiente de correlação de 0,96, apresentando grandezas muito parecidas, por isso é pertinente a comparação.

As plantas ligeiramente deficientes têm velocidade de absorção maior que as plantas bem nutridas, isso, em razão do estado iônico interno, pois plantas saturadas em íons absorvem menos que outras que tenham poucos íons (PRADO, 2008). No experimento 2, a deficiência era maior, portanto, a produção já estaria comprometida. Em condição de deficiência acentuada, a velocidade de absorção diminui, pois ocorrem desarranjos metabólicos irreversíveis (PRADO, 2008), mas mesmo assim, observou-se resposta a doses, e praticamente se igualou com a média geral da biomassa e altura observada no experimento 1 (Tabela 2).

Além de que, no experimento 2 as doses de N foram crescentes, com intervalos exponenciais (0 - 5 - 10 - 20 - 40 - 80 mg dm⁻³ de N), enquanto que, no experimento 1, as doses foram equidistantes e com intervalos maiores (0 - 25 - 50 - 75 - 100 mg dm⁻³ de N). Este fato também influenciou as respostas das plantas ao N.

A falta de resposta quanto ao acúmulo de biomassa no experimento 1 pode ter sido devido ao tempo entre a aplicação do fertilizante e a coleta ser relativamente curto (10 dias). Somado a isto, é possível que o N do substrato formado por amostra de solo tenha sido suficiente para suprir as demandas iniciais das plantas, tanto que, no tratamento sem a aplicação de N, o acúmulo de N foi igual aos tratamentos nos quais foram aplicados nitrogênio (Figura 4). Portanto, o experimento 1 talvez não tenha sido adequado para estudar o efeito de doses, além de que as doses foram muito espaçadas (25 mg dm⁻³ de N) para plantas de cana-de-açúcar, pois esta cultura responde pouco a N na fase inicial (cana-planta) (VITTI et al., 2008). Esta falta de resposta a doses do experimento 1 (com amostra de solo), foi uma das razões para a montagem do experimento 2 com areia e vermiculita, assim, para o experimento 2, reduziu-se as doses e preconizou-se um ambiente com pouco nitrogênio, como explicado inicialmente.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as variáveis analisadas nos experimentos 1 e 2

TRATAMENTOS		VARIÁVEIS			
	aRN	Altura	MSPA	MSSR	Teor de N
Experimento 1: Cultivar IACSP93-3046 cultivada em substrato natural (Amostra de solo)					
Doses de N (F)	0,35 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,59 ^{ns}	-	2,34 ^{ns}
Média geral	1,33	29,9	7,13	-	6,68
C.V. (%)	11,34	6,03	14,28	-	6,88
Experimento 2: Cultivar IACSP95-5000 cultivada em substrato areia + vermiculita					
Doses de N (F)	30,12***	4,98**	3,38*	1,21 ^{ns}	2,28°
Média geral	0,57	27,55	9,09	9,49	4,04
C.V. (%)	22,02	7,91	12,99	9,28	28,13
	Teor de N foliar	Acúmulo de N	Teor de N-NO ₃ ⁻	ICF folha 0	ICF folha +1
Experimento 1: Cultivar IACSP93-3046 cultivada em substrato natural (Amostra de solo)					
Doses de N (F)	1,29 ^{ns}	0,79 ^{ns}	0,89 ^{ns}	0,62 ^{ns}	-
Média geral	21,70	47,57	0,40	50,34	-
C.V. (%)	4,11	15,84	15,16	5,93	-
Experimento 2: Cultivar IACSP95-5000 cultivada em substrato areia + vermiculita					
Doses de N (F)	48,12***	4,78***	10,78***	29,86***	60,62***
Média geral	14,17	36,87	0,47	39,47	42,05
C.V. (%)	7,71	25,28	17,76	8,07	5,17

^{ns}, ***, **, *, ° = não significativo, significativo aos níveis de 0,1; 1; 5 e 10% de probabilidade, respectivamente

Tabela 3. Resumo da análise de variância para as variáveis analisadas no experimento 2 (doses: 0 - 5 - 10 - 20 mg dm⁻³ de N)

TRATAMENTOS	VARIÁVEIS				
	aRN	Altura	MSPA	MSSR	Teor de N
Experimento 2: Cultivar IACSP95-5000 cultivada em substrato areia + vermiculita					
Doses de N (F)	76,21***	6,39*	8,42*	0,47 ^{ns}	1,46 ^{ns}
Modelo (F)	223,56***	17,01***	16,01***	-	-
C.V. (%)	19,28	8,57	12,07	8,79	36,14
	Teor de N foliar	Acúmulo de N	Teor de N-NO ₃ ⁻	ICF folha 0	ICF folha +1
Doses de N (F)	67,8***	4,93*	14,26***	41,12***	77,73***
Modelo (F)	63,58***	12,25***	15,61***	31,22***	56,93***
C.V. (%)	8,22	30,70	19,02	8,28	5,90

^{ns}, ***, *, = não significativo, significativo aos níveis de 0,1 e 5 de probabilidade, respectivamente

5.3.1 Experimento 1: Avaliações em plantas cultivadas em substrato natural (Amostra de solo)

Observaram-se diferenças significativas do teor de N na parte aérea e do teor de N na folha do tipo +1 das plantas de cana-de-açúcar em função da aplicação de doses de nitrogênio (Tabela 2). Notou-se que houve um incremento, com ajuste quadrático, nos teores de nitrogênio foliar, os quais atingiram 22,11 g kg⁻¹ com o uso de 52 mg dm⁻³ de N. Na ausência de aplicação de N, o teor foi de 20,90 g kg⁻¹ (Figura 2), teor este, adequado, quando se comparado a literatura. Segundo Raij e Cantarella (1997), para que os teores de nitrogênio na folha + 1 da cana-de-açúcar sejam considerados adequados, precisam estar entre 18 a 25 g kg⁻¹. Contudo, as plantas não estavam nas condições recomendadas para a realização da diagnose foliar (idade e ambiente), portanto, não foi possível a comparação com as faixas de suficiência, servindo os resultados das grandezas, para a reafirmação de que se deve proceder a coleta de folhas respeitando as indicações das tabelas de recomendações.

Na avaliação dos teores de N na parte aérea, observou-se uma relação linear entre o teor e a dose de nitrogênio aplicada. Na ausência de aplicação, o teor foi de

6,28 g kg⁻¹ e, à medida que se aumentou a dose de N, o teor também aumentou, até 7,08 g kg⁻¹ para a dose de 100 mg dm⁻³ (Figura 3).

Robinson et al. (2011) notaram que em 24 horas da aplicação de doses de N, se observa o efeito no aumento de teores de formas de N em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições controladas, porém na ocasião, a biomassa não foi afetada em função do curto intervalo entre a aplicação e determinações analíticas. Prado e Pancelli (2008) também observaram efeitos da adubação nitrogenada, porém o estudo foi avaliado no quarto mês após o corte da primeira e segunda soqueira da cana-de-açúcar, sendo que avaliaram os teores de N na folha +3.

Ishikawa et al. (2009) realizaram dois experimentos de campo com cana-de-açúcar adubada com dois níveis de N. Observaram no primeiro ano, que as plantas não se diferenciaram quanto ao acúmulo e teor de N, porém no segundo ano, foi observado incremento desta variável em resposta a maior dose. Os autores atribuíram os diferentes efeitos ao fator chuva sobre a eficiência da adubação.

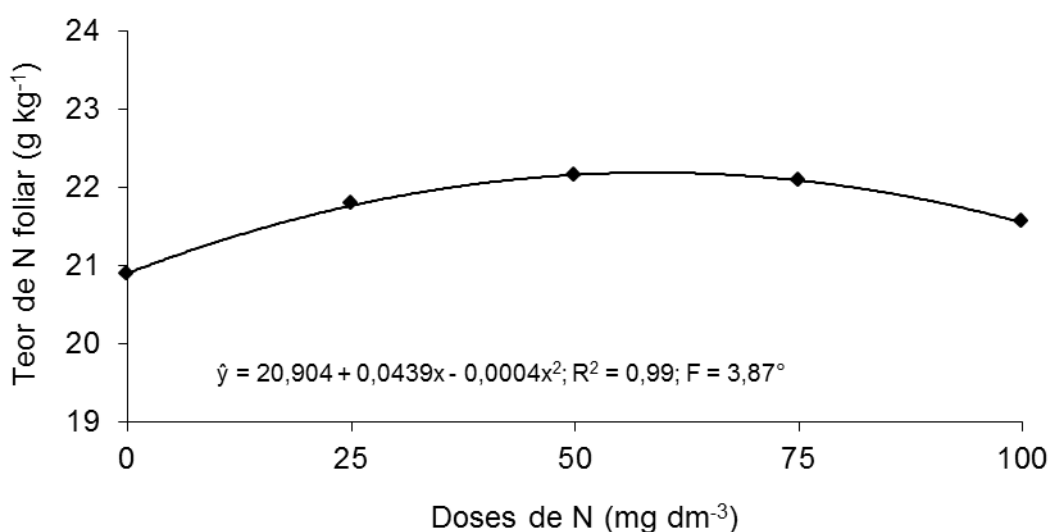


Figura 2. Teor de nitrogênio total foliar (folha +1) em plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função da dose de N. ° = significativo ao nível de 10% de probabilidade

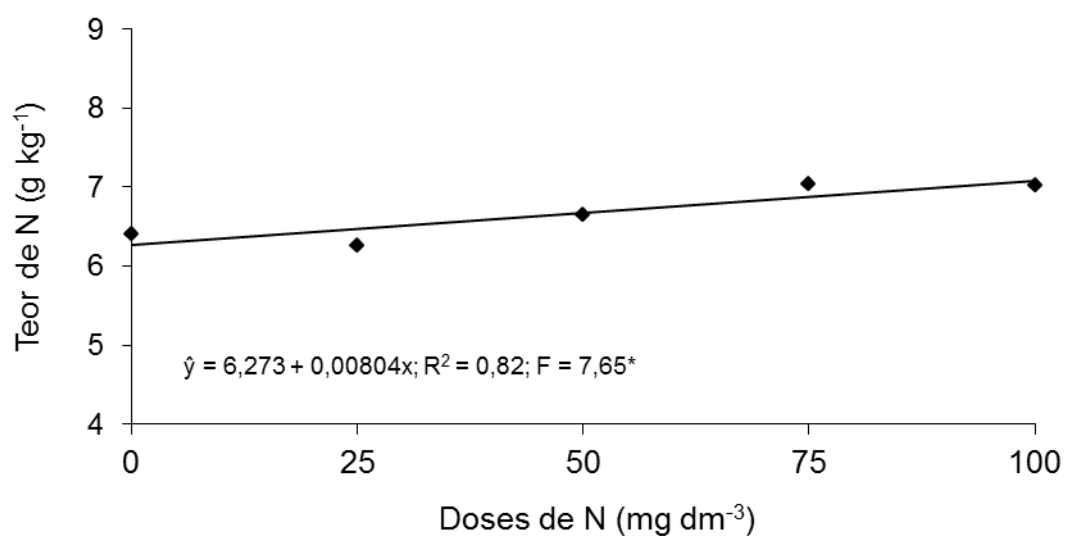


Figura 3. Teor de nitrogênio total na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função da dose de N. * = significativo ao nível de 5% de probabilidade

As variáveis aRN, altura, MSPA, acúmulo de N, teor de nitrato e leitura ICF) não foram afetadas em função das doses de nitrogênio, apresentando valores médios de 1,33 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^- ; 29,9 cm; 7,13 g planta⁻¹; 47,57 mg planta⁻¹; 0,4 mg g⁻¹ e 50,33; respectivamente (Figura 4).

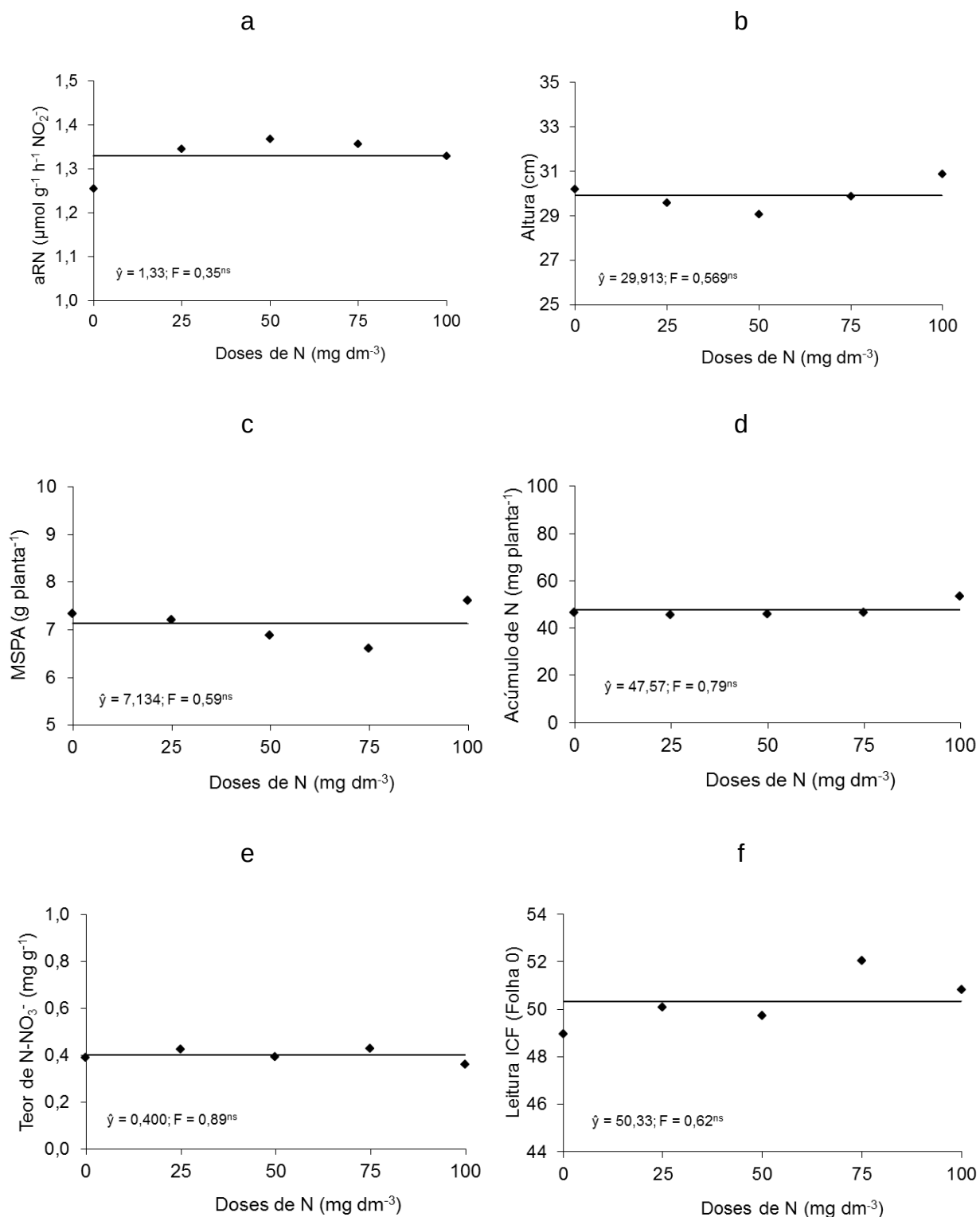


Figura 4. Atividade da redutase do nitrato na folha 0 (A), Altura de plantas (B), MSPA (C), acúmulo de N na parte aérea (D), teor de nitrato na folha 0 (E) e ICF total na folha 0 (F) de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP93-3046, em função da dose de N. MSPA = Massa seca de parte aérea, ICF = Índice de clorofila Falker, ^{ns} = não significativo

No estudo de Chen et al. (2004), com espinafre e mais duas espécies de hortaliças *Brassicaceae*, diferindo dos resultados deste experimento, os autores observaram que quando adubadas com doses de KNO_3 , nitrato prontamente disponível, mesmo em quantidades inferiores ($0,025$ a $0,1 \text{ g planta}^{-1}$ de N) em relação às doses usadas no presente experimento, as plantas expressaram respostas tanto no acúmulo de nitrato foliar, como no aumento da aRN em relação as plantas não adubadas.

Num experimento com amostra de solo coletada também de um Latossolo Vermelho em Jaboticabal – SP, a adubação nitrogenada não foi importante para a produção de matéria seca da cana-planta (BASTO; CAZETTA; PRADO, 2010). Os autores atribuíram a falta de resposta à preferência da planta pela utilização do N mineralizado do solo, presença do N no tolete da muda e também a associação com bactérias fixadoras de N. Ishikawa et al. (2009) também observaram, no primeiro ano de seus estudos, a falta de resposta a N da cana-de-açúcar quanto a produção de biomassa. Porém, no segundo ano, as respostas foram evidentes. Esta observação pode estar ligada à eficiência da aplicação do fertilizante e ao tipo de cultura.

Em todas as amostras, desde o controle sem N até a dose de 100 mg dm^{-3} de N, que foram analisadas sem a adição de KNO_3 no meio de incubação, não se observou leitura colorimétrica no espectrofotômetro, ou seja, a aRNe foi zero (Dados não apresentados). Já com a adição de nitrato ao meio (aRNi), os valores médios de atividade foram de $1,33 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de NO_2^- (Figura 4A). No estudo de Silva (1989), também com cana-de-açúcar, foram determinadas ao longo do tempo em condições de campo, a aRNe e a aRNi, contudo, de forma análoga ao presente trabalho observaram aRNe em folhas com valores próximos de zero, mas comentou que, aos 160 dias após a adubação nos tratamentos adubados com 120 e 240 kg ha^{-1} de N houve observação de aRNe no colmo, porém, neste momento apenas.

Scheuwater et al. (2002), não tiveram como objetivo o estudo da “Reativação enzimática” em oito gramíneas forrageiras mas, realizaram a análise da aRN em tecidos com nitrato adicionado ao meio e também sem a adição de forma similar ao presente estudo. Os autores comentam que observaram a redução de nitrato, predominantemente nas folhas, quando sem a presença de nitrato exógeno. Porém,

não chegaram a apresentar estes resultados e, relataram grande variabilidade entre as amostras que receberam o mesmo tratamento.

No estudo de Villalobos e Carvajal (1977), com cana-de-açúcar, os autores chegaram a observar leituras colorimétricas quando sem a aplicação de nitrato exógeno, mas foi reduzida em relação às outras espécies. Com isto, a baixa atividade da RN observada estava possivelmente associada com a baixa concentração de N-NO_3^- no tecido foliar. Ainda comparando os atuais resultados com o trabalho de Villalobos e Carvajal (1977), possivelmente, a observação de leituras colorimétricas nos tratamentos sem a aspersão de nitrato nas folhas, pode ter sido devido às plantas terem sido adubadas anteriormente com a fonte nitrato de amônio (25 dias antes), fonte esta, cujo nitrato está numa forma prontamente absorvível pelas raízes. As grandes diferenças entre o trabalho de Villalobos e Carvajal (1977) e o presente, são que, os autores no primeiro caso, fizeram a aspersão de solução de KNO_3 0,15 M vinte quatro horas antes da análise da aRNi e aRNe nas folhas de plantas cultivadas no campo, e ainda, não analisaram tecidos proveniente da mesma folha. Outros autores também relatam a observação de baixos níveis de nitrato nos tecidos de cana-de-açúcar (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967; SILVERA; CROCOMO, 1990; ISHIKAWA et al., 2009).

Estes resultados sugerem que o NO_3^- é prontamente metabolizado ao chegar ao citoplasma das células devido à presença da enzima, por isso, não terá nitrato nos tecidos, ou muito pouco. No caso do nitrato ser mesmo prontamente metabolizado, não é de se esperar que sem a adição de nitrato exógeno, a enzima expresse atividade, pois o íon é substrato da enzima.

A atividade observada com a adição de KNO_3 significa que existem enzimas em excesso e escassez de nitrato, ou seja, já ocorreu a redução e assimilação. Diferentemente da gramínea *Lolium multiflorum* estudada por Bar-Akiva, Sagiv e Leshem (1970) que, segundo os resultados dos autores, apresentou acúmulos de nitrato de quase 10 vezes superiores aos observados no presente trabalho. Talvez por isso, a verificação de atividade da enzima nos tratamentos analisados na ausência de KNO_3 no meio. No mesmo estudo, os autores observaram que, tanto a aRNi como a aRNe, aumentaram a medida que se incrementou a dose de N. O mesmo comportamento foi observado para o teor de nitrato foliar. Contudo, a

produção foi máxima com a dose intermediária (600 kg ha^{-1} de N), dose esta impraticável para as condições brasileiras.

No caso do presente estudo, a “Reativação enzimática” observada foi direto a aRN, pois esta, só foi possível devido a aplicação de nitrato no meio de incubação, por isso, não foi possível verificar, pelo cálculo do índice proposto por Bar-Akiva, Sagiv e Leshem (1970), se a atividade da enzima RN pode ser indicativa do estado nutricional, em nitrogênio, de plantas de cana-de-açúcar, portanto, ainda existe a necessidade da definição de um critério, baseado na atividade da enzima, para a indicação do estado nutricional.

5.3.2 Experimento 2: Avaliações em plantas cultivadas em substrato areia mais vermiculita

De modo geral, ao avaliar estatisticamente os dados integrais obtidos, nota-se que, houve um aumento com ajuste quadrático ($R^2 = 0,77$) da aRN, no qual atingiu $1,08 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de NO_2^- com o uso de 97 kg ha^{-1} de N (Figura 5). Contudo, percebeu-se que os dados oriundos apenas dos tratamentos com as menores doses ($0, 5, 10$ e 20 mg dm^{-3} de N), se ajustaram melhor a uma curva do tipo linear (Figura 5), com um coeficiente de determinação de $0,98$; portanto, esta curva representou melhor este conjunto de dados.

Após análise estatística de somente estes dados, notou-se um aumento da aRN representado pela equação $\hat{y} = 0,0696 + 0,0461x$. Uma atividade da RN na ordem de $0,99 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de NO_2^- foi observada com a aplicação de 20 mg dm^{-3} de N (Figura 5). Lavres Junior, Santos Junior e Monteiro (2010) usaram doses de solução nutritiva (64,4% de nitrato e 35,6% de amônio) em capim Mombaça, e também observaram aumento da aRN em resposta ao incremento de doses, sendo que a atividade da RN aumentou de forma brusca no início, atingindo um determinado patamar e se mantendo, porém os autores observaram que os dados se ajustaram melhor a uma curva do tipo exponencial.

A baixa atividade observada no tratamento sem N pode ter sido devido ao fato de as plantas estarem num momento de carência de N, e a ausência de N-NO_3^- se constitui em um processo regulatório da enzima, cuja atividade é diminuída devido

ao nitrato ser indutor da síntese e também ser substrato da enzima (CAMPBELL, 1999; KONISHI; YANAGISAWA, 2011), apresentando então baixa quantidade de enzima. Todavia, este comportamento inicial com aumento brusco da atividade ao ser adicionado nitrogênio ao meio de cultivo, mesmo em doses inferiores às recomendadas, pode ter sido devido à ocorrência de rápido desencadeamento da transcrição da enzima, aumentando a concentração nas plantas, com consequente uso do substrato nitrato disponível no citoplasma (LILLO, 2008), por isso, a observação do aumento da atividade. Entretanto, há um limiar onde o substrato não mais afeta a atividade da enzima devido à limitação dos sítios catalíticos das RN da planta estarem ocupados, portanto, observa-se a estabilização da atividade.

Em alguns experimentos com cana-de-açúcar analisados em longo prazo após a adubação (ABAYOMI; ETEJERE; FADAYOMI, 1988; SILVA, 1989; SILVEIRA; CROCOMO, 1990), e inclusive em curto prazo após a aspersão foliar de nitrato (VILLALOBOS; CARVAJAL, 1978), a aRN correlacionou-se positivamente com o incremento de doses de N, o que sugere que as respostas observadas no presente estudo possam acontecer também em condições de campo.

Quanto às determinações da aRNe e aRNi, de forma semelhante ao experimento 1, não se observou leituras colorimétricas nas amostras analisadas sem nitrato no meio (dados não apresentados). Portanto, os valores de aRN apresentados na Figura 5, são apenas os obtidos com a adição de nitrato no momento da análise (aRNi).

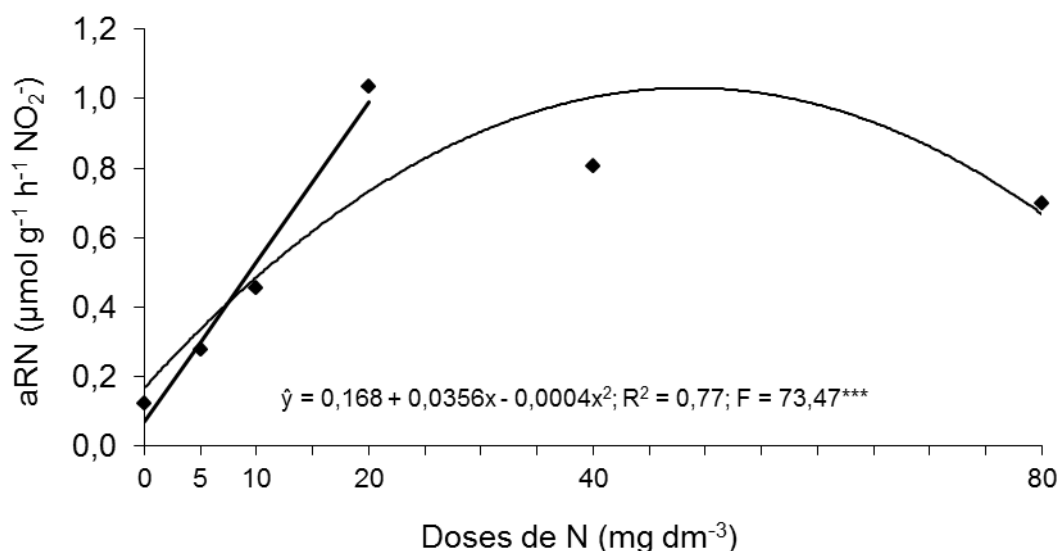


Figura 5. Atividade da redutase do nitrato nas folhas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Na avaliação da variável altura, procedeu-se a análise estatística com o conjunto integral dos dados e, separadamente, com o conjunto das menores doses de N (0, 5, 10 e 20 mg dm^{-3}). Nota-se que, no primeiro caso, houve um incremento, com ajuste quadrático na altura das plantas, as quais atingiram 30,82 cm com o uso de 45,5 mg dm^{-3} de N (Figura 6). Por outro lado, analisando apenas as doses iniciais, notou-se um aumento com a equação $\hat{y} = 24,270 + 0,3238x$ ($R^2 = 0,89$). Observou-se que, a altura aumentou até 30,71 cm na dose de 20 mg dm^{-3} de N (Figura 6).

De modo geral, os resultados dos dois conjuntos de dados mostraram diferença após a dose de 10 mg dm^{-3} de N (Figura 6). Assim, o melhor modelo talvez seja o obtido com o conjunto integral dos dados.

Com a análise do conjunto integral dos dados de MSPA, notou-se que houve um aumento com ajuste quadrático em função das doses de N aplicadas, porém, com um coeficiente de determinação muito baixo ($R^2 = 0,47$) (Figura 7). A MSPA, neste caso, atingiu 10,24 g planta^{-1} com a aplicação da dose de 43 mg dm^{-3} de N. Ao serem excluídos da análise estatística os dados obtidos com a aplicação das maiores doses (40 e 80 mg dm^{-3} de N), notou-se um aumento linear ($R^2 = 0,83$), com

a equação $\hat{y} = 7,785 + 0,1484x$, sendo que, a medida que aumentou a dose de N, a MSPA aumentou até 32,18 g planta⁻¹ na dose de 20 mg dm⁻³ de N (Figura 7).

A MSSR não foi afetada pelas doses de nitrogênio (Tabela 2), apresentando valor médio de 9,46 g planta⁻¹ (Figura 7). Ressalta-se que a massa seca de toletes, no momento da coleta, não apresentou diferença significativa pelo teste F (média 6,08 g, $F = 0,57^{ns}$, $CV = 10,55\%$), por isso foi incluída nas pesagens para se determinar a MSSR.

Infere-se que tanto para a altura como para o acúmulo de biomassa (Figuras 6 e 7) houve prejuízos com a aplicação de doses elevadas. Esta observação pode estar ligada a toxidez por NH₃, pois as quantidades de amônia liberada da uréia pode não ter sido completamente oxidada a nitrato, sendo que a microflora do solo, grande responsável por este processo, provavelmente ocorreu em uma população reduzida em comparação com o experimento 1 (com amostras de solo natural). Cantarella (2007) descreve que a hipótese da toxidez pela amônia é passível de ocorrer quando esta não é convertida a amônio, além de que, esta forma é perdida por estar no estado gasoso.

Além disso, as plantas podem ter absorvido na forma de amônio, uma vez que é a forma preferencial pelas plantas de cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011) ou mesmo, na forma de uréia, e as plantas não tenham tido a capacidade de assimilar todo amônio absorvido, com isto a toxidez. Todavia, para maiores esclarecimentos seria interessante ter analisado os níveis de atividade da glutamina sintetase nos tecidos, que é a enzima responsável pela assimilação do amônio (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010), mas isto não foi realizado no presente estudo.

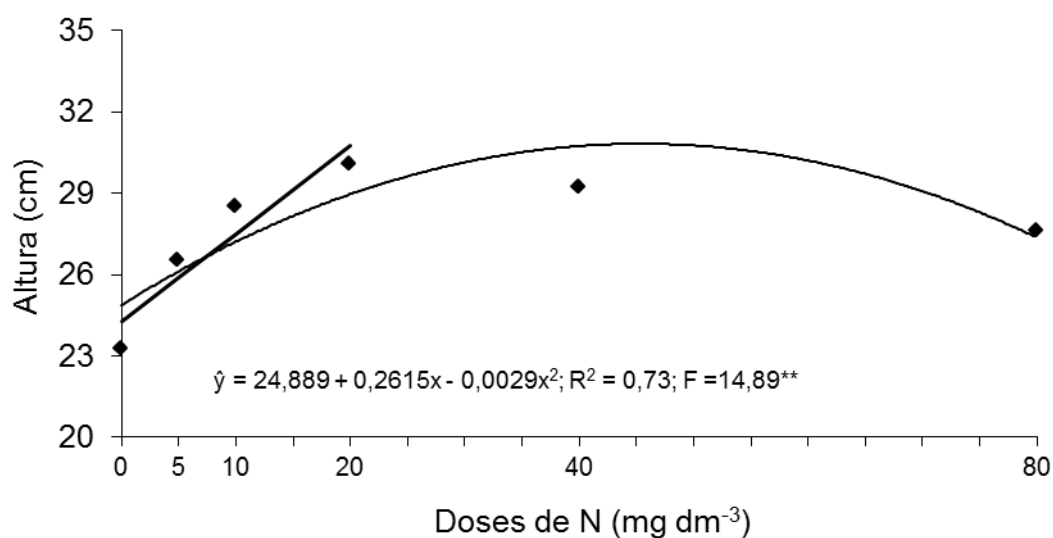


Figura 6. Altura das plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

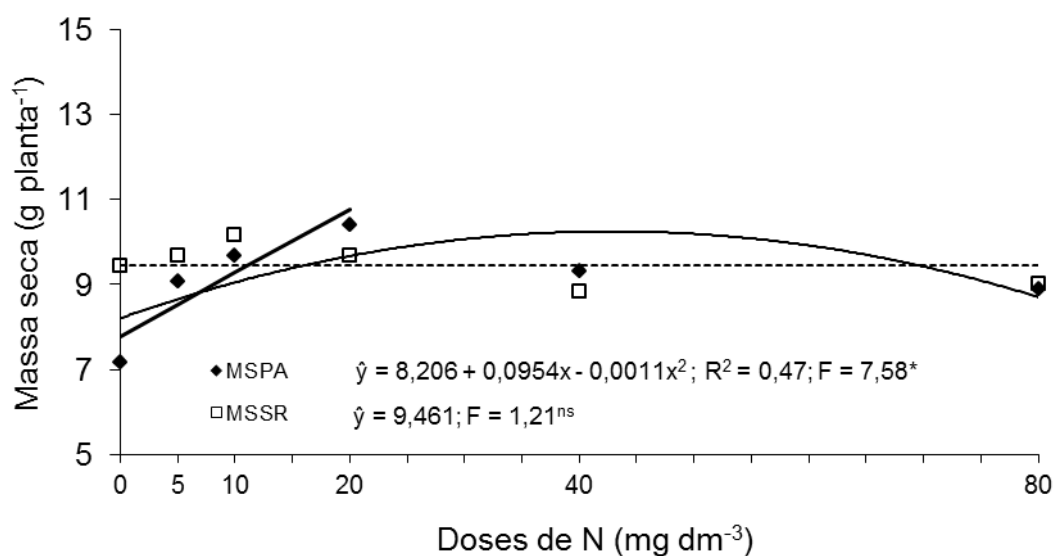


Figura 7. Massa seca da parte aérea (MSPA) e de sistema radicular (MSSR) de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. * = significativo ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} – não significativo

De maneira similar às análises estatísticas das variáveis descritas até agora, o conjunto integral dos dados de teor de N foliar, aumentou com ajuste quadrático em função das doses de N aplicadas, porém com um coeficiente de determinação baixo ($R^2 = 0,58$), os quais atingiram $18,66 \text{ g kg}^{-1}$ com o uso de 53 mg dm^{-3} de N (Figura 8). Ressalta-se, desta vez, que na ausência de aplicação de N, com base na

equação quadrática, o teor foi de 10,34 g kg⁻¹, valor este superior ao observado no outro conjunto de dados (7,08 g kg⁻¹). O melhor ajuste, neste caso, foi também o quadrático, porém com um coeficiente de determinação de 0,96; onde se notou aumento com a equação $\hat{y} = 7,082 + 1,4176x - 0,0485x^2$.

O teor foliar de N aumentou até 16,04 g kg⁻¹ na dose de 20 mg dm⁻³ de N, com um ponto máximo de 17,43 g kg⁻¹ na dose de 15 mg dm⁻³ de N (Figura 8). Apesar destes teores não serem comparáveis com os considerados adequados por Raij e Cantarella (1997) por questões de amostragem, notou-se de forma geral, teores bem baixos quando não se aplicou N. E com a aplicação de N, independentemente da dose, os níveis aumentaram, mas não ultrapassaram o limite inferior da faixa de suficiência de Raij e Cantarella (1997), que é de 18 a 25 g kg⁻¹, confirmando que teores foliares são representativos do estado nutricional de plantas de cana-de-açúcar, mas para serem comparáveis com as tabelas pré-estabelecidas existe a necessidade de padronização das condições de amostragem foliar.

Observou-se uma relação linear entre o teor de nitrogênio na parte aérea e a dose de nitrogênio aplicada. Na ausência de aplicação, o teor foi de 3,45 g kg⁻¹ e à medida que se aumentou a dose de N, o teor também aumentou, até 5,28 g kg⁻¹ para a dose de 80 mg dm⁻³ (Figura 9). Este comportamento linear, em relação ao quadrático observado no teor de N foliar, indica que, o nitrogênio absorvido foi incorporado não só na folha diagnóstica, mas também no restante dos tecidos da planta, porém em menores proporções. Ao analisar somente os primeiros quatro níveis de N aplicados, não se observou diferença estatística (Tabela 3).

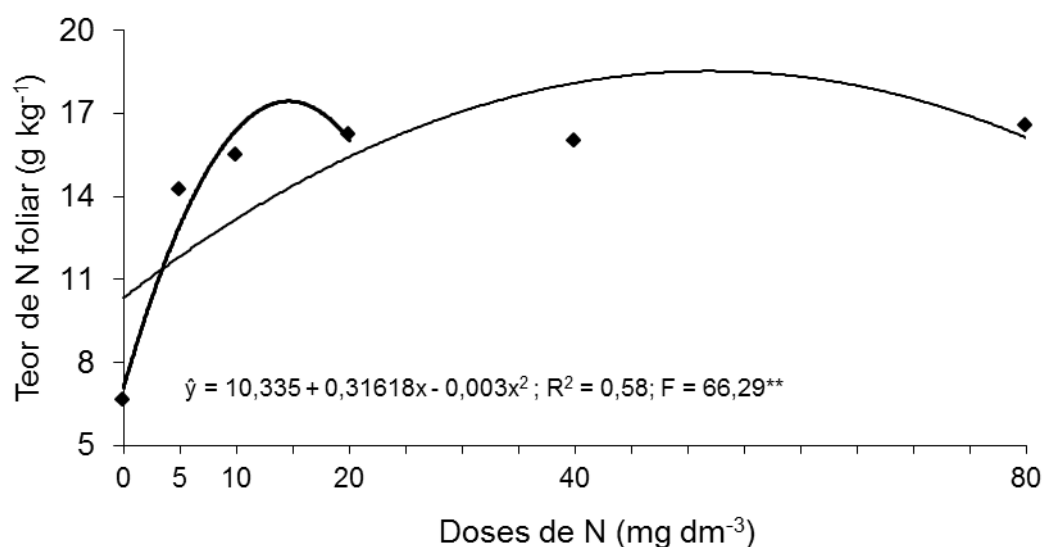


Figura 8. Teor de nitrogênio total foliar (folha +1) em plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

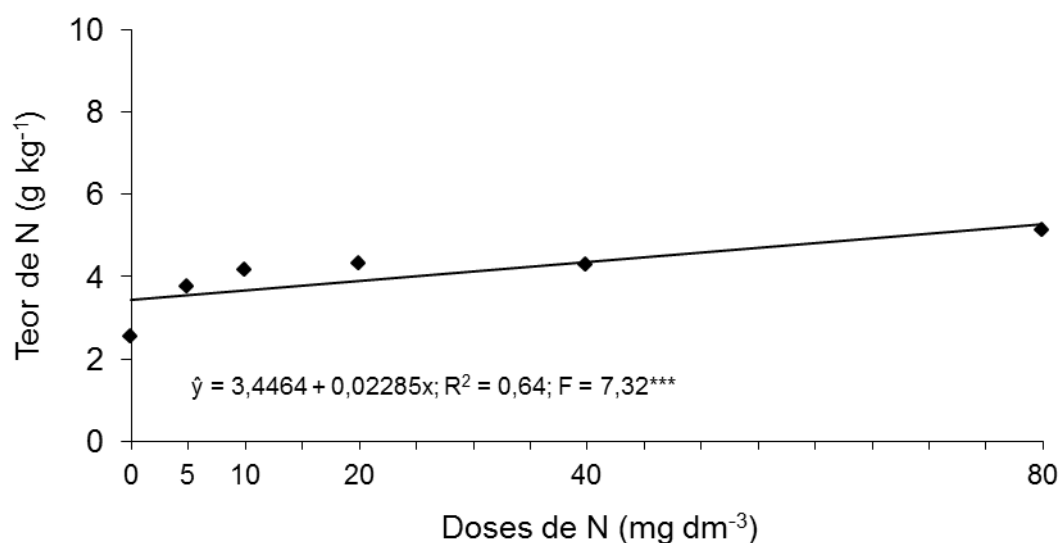


Figura 9. Teor de nitrogênio total na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

A análise estatística do conjunto integral dos dados de acúmulo de N na parte aérea mostrou que os dados se ajustaram melhor a uma curva quadrática em função das doses de N aplicadas, porém, com um coeficiente de determinação baixo ($R^2 =$

0,61). O maior acúmulo de N foi observado na dose de 56 mg dm^{-3} de N e foi de $48,5 \text{ mg planta}^{-1}$ (Figura 10). Ao se excluir da análise estatística os dados obtidos com as duas maiores doses aplicadas (40 e 80 mg dm^{-3} de N), observou-se um ajuste dos dados ao modelo linear ($R^2 = 0,83$) (Figura 10), onde o acúmulo aumentou com a equação $\hat{y} = 23,212 + 1,2363x$ e atingiu $44,75 \text{ mg planta}^{-1}$ com o uso da dose de 20 mg dm^{-3} de N (Figura 10). Robinson et al. (2011) constataram que a aplicação de doses de N em plantas de cana-de-açúcar, cultivadas em condições controladas, promoveu o aumento do N acumulado nos tecidos após 24 horas da aplicação. Ishikawa et al. (2009), observaram em condições de campo, que no segundo ano de estudo esta variável aumentou em resposta a maior dose de N.

Observou-se que com o uso da dose de 5 mg dm^{-3} de N, o acúmulo de N foi de $32,5 \text{ mg planta}^{-1}$, contudo, no momento de aplicação dos tratamentos, foi adicionado ao vaso 50 mg por planta. Tendo em vista que o substrato areia mais vermiculita apresenta quantidades insignificantes de N, sugere-se que grande parte do nitrogênio incorporado foi proveniente do fertilizante aplicado, e ainda, que o nitrogênio que não foi absorvido, ou se perdeu por algum processo, ou mesmo tenha permanecido no substrato, por incapacidade de ser incorporado às plantas devido ao curto período de análise das plantas após a aplicação de N.

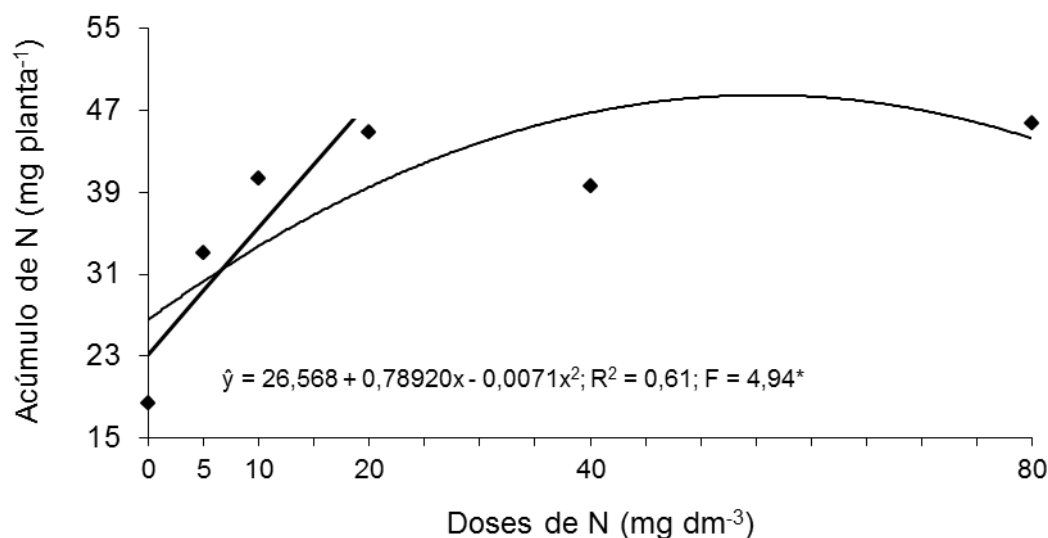


Figura 10. Acúmulo de nitrogênio total na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. * = significativo ao nível de 5% de probabilidade

O teor de nitrato foliar analisado estatisticamente em todo conjunto de dados obtidos, reduziu com ajuste quadrático em função das doses de N aplicadas, porém com um coeficiente de determinação muito baixo ($R^2 = 0,35$), o menor valor observado foi de $0,35 \text{ mg g}^{-1}$ com o uso de 47 mg dm^{-3} de N. Na ausência de aplicação de N, foi constatado o maior teor de nitrato ($0,58 \text{ mg g}^{-1}$) (Figura 11).

Ao se excluir da análise estatística os dados obtidos com as doses de 40 e 80 mg dm^{-3} de N, observou-se um ajuste que parece representar melhor os dados de teores de nitrato com a aplicação destas doses ($R^2 = 0,96$) (Figura 11). Notou-se então, diminuição com a equação $\hat{y} = 0,724 - 0,0582x + 0,0021x^2$ à medida que se aumentou a dose de N. O menor teor desta vez ($0,3 \text{ mg g}^{-1}$) foi observado com a aplicação da dose de 15 mg dm^{-3} de N. Sem a aplicação de N, o teor de nitrato passou a ser de $0,72 \text{ mg g}^{-1}$ (Figura 11).

Analisando os dados obtidos com as doses de 0 a 20 mg dm^{-3} de N somente, observou-se que com o uso da dose de 15 mg dm^{-3} de N o teor de nitrato foi mínimo. Isto coincidiu com os pontos máximos das variáveis leituras ICF das folhas 0 e +1 (Figura 8) e teor de N foliar (Figura 12), portanto, inversamente proporcional ao comportamento destas variáveis. As plantas com baixo teor de nitrato, deveriam ter apresentado baixa aRN, mas isto não aconteceu, o que indica que todo o nitrato à

medida que foi sendo absorvido imediatamente foi reduzido pela alta quantidade de RN (dose alta), sendo proporcional, à medida que aumentou-se a dose, aumentou também o acúmulo de N na planta (Figura 10), ou seja, foi assimilado. Inferindo-se que na ausência de aplicação de N, os maiores teores de nitrato foram observados devido à falta de RN cuja síntese é induzida pelo íon (KONISHI; YANAGISAWA, 2011), sendo que a expressão gênica controla o nível de RN no citossol (KAISER; WEINER; HUBER, 1999).

Apesar de ter sido baixa a média de concentração de nitrato observada nos tecidos foliares (Tabela 2) de forma semelhante a vários estudos (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967; SILVA, 1989; SILVERA; CROCOMO, 1990; ISHIKAWA et al., 2009), observou-se que, possivelmente, a enzima RN tenha sido induzida por estas concentrações. Em contrapartida, ao analisar a aRN em meio de incubação sem a presença de nitrato, não se observou atividade ($aRNe = 0$), esta observação é semelhante ao encontrado no estudo de Silva (1989) e sugere que, existam dois reservatórios de nitrato na célula, cujo um deles é de rápida duração e está ligado a regulação da síntese da enzima e, o outro, de existência mais longa ligado ao suprimento de substrato (SOUZA; STARK; FERNANDES, 2002).

De forma contrastante aos resultados do presente trabalho, Silva (1989) observou, em condições de campo, que o teor de nitrato aumentou com o incremento de doses de N na forma de uréia (120 e 240 kg ha⁻¹ de N). Entretanto, este comportamento pode ter sido observado por conta das plantas estarem em condições de campo e em plena fase de alta absorção, pois plantas em períodos de alta exigência de N aproveitam melhor o nitrato do solo.

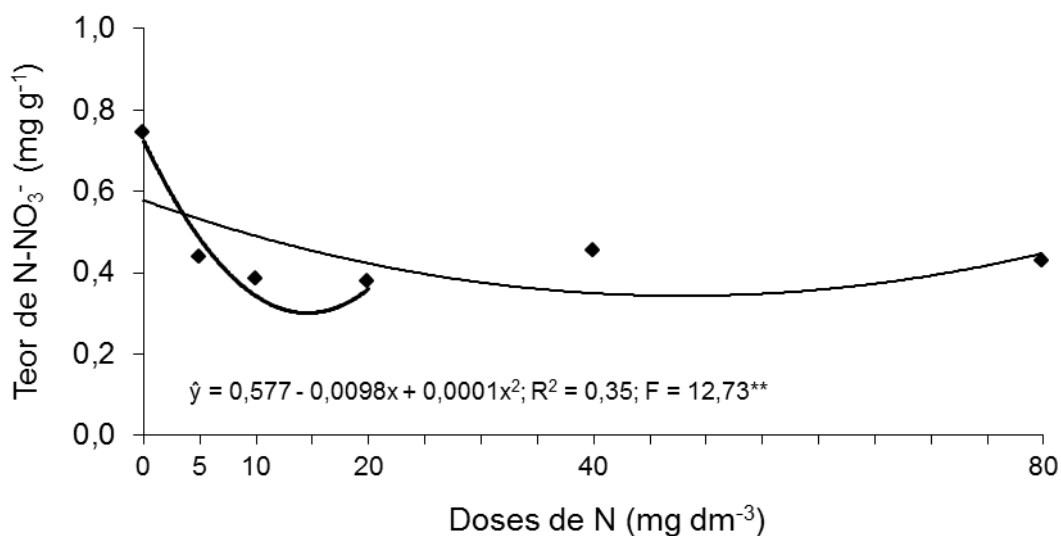


Figura 11. Teor de N-NO₃⁻ na folha 0 de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

Para as leituras do índice de clorofila Falker (ICF) das folhas 0 e +1, a análise estatística dos dados obtidos com todas as doses em conjunto, apontou tendência a um aumento com ajuste quadrático em função da dose de N aplicada, porém, com coeficientes de determinação baixos (0,72 e 0,53), nas quais as leituras atingiram, respectivamente, 50,74 e 51,73 adimensionais, com a aplicação de 51 e 47 mg dm⁻³ de N (Figura 12).

Entretanto, ao se excluir das análises estatísticas os dados obtidos com as doses de 40 e 80 mg dm⁻³ de N, observou-se uma curva com melhor representação do conjunto de dados para as duas variáveis (Figura 12). Com isso, analisando estatisticamente somente estes dados (0 a 20 mg dm⁻³ de N), notaram-se aumentos, com as equações $\hat{y} = 23,359 + 2,9618x - 0,0959x^2$ e $\hat{y} = 26,341 + 3,1778x - 0,1021x^2$ ($R^2 = 0,99$ e $0,98$). O ICF observado nas folhas do tipo 0 e +1, respectivamente, aumentaram até pontos de máxima de 46,20 e 51,09 na dose de 16 mg dm⁻³ de N (Figura 12).

Este comportamento parece representar melhor o fenômeno biológico, pois nas doses iniciais o ICF foi inferior, o que permite inferir que o teor de clorofila, grande responsável pela fotossíntese, também era baixo. Em plantas de mamoneira a leitura ICF determinada no ClorofiLOG[®] apresentou alta correlação positiva com o

teor de clorofila (RIGON et al., 2012). Segundo Mazid, Khan e Mohammad (2012) o poder redutor, além de produtos como açúcares e fito-hormônios oriundos da fotossíntese, influenciam a aRN. Com isto, o comportamento do ICF em relação à aplicação de baixas quantidades de N foi parecido com o da aRN (Figura 5) e idêntico ao comportamento do teor foliar de N (Figura 8).

Fidelis et al. (2012) estudaram genótipos de plantas de arroz, em baixo e alto nível N e observaram que o índice de clorofila foliar responde positivamente ao incremento da dose do insumo nitrogenado para a maioria das cultivares estudadas. No estudo de Silva et al. (2011a), o uso do clorofilômetro, da marca ClorofiLOG[®], em capim Tifton 85 cultivado em solos hidromórficos de baixada, dispensou a extração direta de clorofilas e constituiu-se num indicador apropriado para se avaliar a eficiência da adubação nitrogenada.

Entretanto, em um experimento de campo com cana-de-açúcar adubada com doses de 50 a 200 kg ha⁻¹ de N, Amaral e Molin (2011) constataram que a correlação do teor foliar de N com a quantidade de clorofila nas folhas mensuradas por clorofilômetro SPAD-502[®], não foi em todos os casos significativa, sendo que as doses aplicadas não afetaram a leitura em todos os experimentos, o que indicou a necessidade de mais pesquisas sobre a folha, a posição e o número de mensurações necessárias para a correta avaliação do teor de clorofila por meio de clorofilômetro, em cana-de-açúcar.

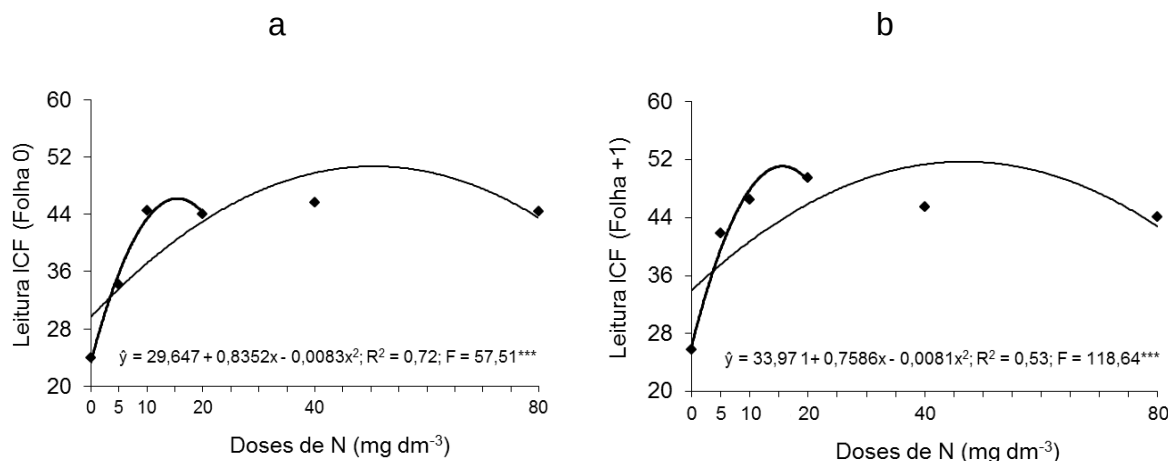


Figura 12. Índice de clorofila total nas folhas dos tipos 0 (A) e +1 (B) de plantas de cana-de-açúcar, cultivar IACSP95-5000, em função da dose de N. ICF = Índice de clorofila Falker; *** = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

5.4 Conclusões

1 - Sob moderada deficiência de N, a atividade da enzima RN em plantas de cana-de-açúcar não é alterada após 12 dias da aplicação de doses acima de 25 mg dm⁻³ de N, na forma de uréia.

2 - Sob severa deficiência de N, a atividade da RN em plantas de cana-de-açúcar é influenciada pela dose de N aplicada. A resposta é crescente e linear em doses inferiores a 20 mg dm⁻³ de N.

3 - Os comportamentos entre o teor de nitrato, teor de N foliar e leitura ICF em folhas de cana-de-açúcar são equivalentes, já a curva do nitrato é inversa a das outras variáveis.

4 - Os teores de nitrato foliar em cana-de-açúcar são muito baixos, e isto, faz com que não haja atividade da RN quando sem a adição de nitrato no meio reacional, no momento da análise.

5 - A atividade da enzima RN apresenta boas perspectivas para indicar o estado nutricional, em nitrogênio, de plantas de cana-de-açúcar, porém, ainda existe a necessidade do estabelecimento de um critério para o diagnóstico.

5.5 Referências

- ABAYOMI, Y. A.; ETEJERE, E. O.; FADAYOMI, O. Effect of nitrogen level and water deficit on nitrate reductase activity NRA from leaves of two sugarcane cultivars - Co 957 1001. **Turrialba**, San Jose, v. 38, n. 4, p. 352-358, 1988.
- AMARAL, L. R.; MOLIN, J. P. Sensor óptico no auxílio à recomendação de adubação nitrogenada em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1633-1642, 2011.
- AMARAL, L. R.; PORTZ, G.; FARIA, T. F.; MOLIN, J. P. Comparação de clorofilômetros como indicadores de suficiência de nitrogênio em cana de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGRICULTURA DE PRECISÃO – ConBAP., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Jaboticabal: SBEA, 2010. p. 1-6.
- BAR-AKIVA, A.; SAGIV, J.; LESHEM, J. Nitrate reductase activity as an indicator for assessing the nitrogen requirement of grass crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 405-407, 1970.
- BAR-AKIVA, A.; STERBAUM, J. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as a measure of the nitrogen requirement in citrus trees. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 6, n. 3, p. 575-577, 1965.
- BASTO, J. C. H. A. G.; CAZETTA, J. O.; PRADO, R. M. Materiais corretivos e nitrogênio na nutrição e na produção de matéria seca de cana-de-açúcar cultivada em vaso. **Interciencia**, Caracas, v. 35, n. 1, p. 55-58, 2010.
- CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 277-303, 1999.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ V., V. H., BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Viçosa, 2007. cap. 7. p. 375-470.
- 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 of Soil Science and Plant Annals**, New York, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- CAZETTA, J. O.; FONSECA, I. M.; PRADO, R. M. Perspectivas de uso de métodos diagnósticos alternativos: testes bioquímicos. In: PRADO, R. M.; CECILIO FILHO, A. B.; CORREIA, M. A. R.; PUGA, A. P. **Nutrição de plantas: diagnose foliar em hortaliças**. 1. ed. Jaboticabal: FCAV/FAPESP/CAPES/FUNDUNESP, 2010. cap. 6. p. 109-134.
- CHEN, B. M.; WANG, Z. H.; LI, S. X.; WANG, G. X.; SONG, H. X.; WANG, X. N. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate

concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. **Plant Science**, Limerick, v. 167, n. 3, p. 635-643, 2004.

COPERSUCAR. **Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas**. São Paulo: Copersucar, 1989. 5 p. (Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: CNPS, 2006. 306 p.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. **Manual do medidor eletrônico de teor de clorofila (ClorofiLOG/CFL 1030)**. Porto Alegre: Falker Automação Agrícola, 2008. 33 p.

FIDELIS, R. R.; KISCHEL, E.; MACHADO, A. F. L.; CANCELLIER, E. L.; PASSOS, N. G. Eficiência no uso de nitrogênio de genótipos de arroz em solos de várzea irrigada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 7, n. 1, p. 264-272, 2012.

FRESCHI, L.; NIEVOLA, C. C.; RODRIGUES, M. A. R.; DOMINGUES, D. S.; VAN SLUYS, M. A.; MERCIERA, H. Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, n. 3, p. 201-212, 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.

ISHIKAWA, S.; ANDO, S.; SAKAIGAICHI, T.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate-N concentration of sugarcane, **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 55, n. 4, p. 485-495, 2009.

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

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA1, in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 52, n. 5, p. 824-836, 2011.

LAVON, R.; GOLDSCHMIDT, E. E. Enzymatic methods for detection of mineral element deficiencies in citrus leaves: a mini-review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, n. 1, p. 139-150, 1999.

LAVRES JUNIOR, J.; SANTOS JUNIOR, J. D. G.; MONTEIRO, F. A. Nitrate reductase activity and spad readings in leaf tissues of guinea grass submitted to nitrogen and potassium rates. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 801-809, 2010.

LEMAÎTRE, T.; GAUFICHON, L.; BOUTET-MERCEY, S.; CHRIST, A.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassilewskija Accession. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 7, p. 1056-1.65, 2008.

LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. **Biochemical Journal**, London, v. 415, n. 1, p. 11-19, 2008.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARETZKI, A.; CRUZ, A. D. Nitrate reductase in sugarcane tissues, **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 8, n. 4, p. 605-611, 1967.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture, **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 7, p. 1141-1157, 2010.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Sofia, v. 1, n. 3, p. 386-414, 2012.

MELO, W. J.; MELO, G. M. P.; BERTIPAGLIA, L. M. A.; MELO, V. P. **Experimentação sob condições controladas**. 1 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1998. 82 p.

OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C. Aspectos agronômicos da ureia tratada com inibidor de uréase. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8, n. 2, p. 403-414, 2012.

PRADO, R. M. **Nutrição de plantas**, São Paulo: Editora Unesp, 2008. 407 p.

PRADO, R. M.; PANCELLI, M. A. Resposta de soqueiras de cana-de-açúcar à aplicação de nitrogênio em sistema de colheita sem queima. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 951-959, 2008.

PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T. MARRIEL, I. E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob

dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 1, p. 41-46, 1994.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. rev. Campinas: IAC, 1997. 285 p. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. p. 231-244. (Boletim Técnico, 100).

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; HAGA, K. I. Atividade da redutase do nitrato em folhas de cafeeiro em função da adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 269-276, 2007.

RIGON, J. P. G.; CAPUANI, S.; BELTRÃO, N. E. M.; BRITO NETO, J. F.; SOFIATTI, V.; FRANÇA, F. V. Non-destructive determination of photosynthetic pigments in the leaves of castor oil plants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 3, p. 325-329, 2012.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019045>>. Acesso em: 15 maio 2013.

RÖMHELD, V. Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. In: MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2012. cap. 11. p. 299-312.

SCHEURWATER, I.; KOREN, M.; LAMBERS, H.; ATKIN, O. K. The contribution of roots and shoots to whole plant nitrate reduction in fast- and slow-growing Grass species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 374, p. 1635-1642, 2002.

SILVA, R. V. M. M.; ROSSIELLO, R. O. P.; MORENZ, M. J. F.; BARBIERI JUNIOR, E.; GOMES, R. L. T.; CAMARGO FILHO, S. T. Uso de clorofilometro na avaliação da adubação nitrogenada e potássica no capim Tifton 85. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 828-839, 2011a.

SILVA, S. M.; OLIVEIRA, L. J.; FARIA, F. P. REIS, E. F.; CARNEIRO, M. A. C.; SILVA, S. M. Atividade da enzima nitrato redutase em milho cultivado sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e potássica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1931-1937, 2011b.

SILVA, E. F. **Efeito da adubação nitrogenada sobre a variação estacional das frações nitrogenadas, atividade da nitrato-redutase, e carboidratos solúveis em**

cana-de-açúcar (*Saccharum* spp, cv. NA 56-79), em condições de campo. 1986. 163 f. Dissertação, (Mestrado em Agronomia-Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, 1986.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de n e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 7-15, 1990.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L M; FERNANDES, M. S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Artware Projetos Culturais, 2002. v. 1. 55 p.

VENKATESAN, S.; GANAPATHY, M. N. K. Nitrate reductase activity in tea as influenced by various levels of nitrogen and potassium fertilizers. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Athens, v. 35, n. 9-10, p. 1283-1291, 2004.

VILLALOBOS, E.; CARVAJAL, J. F. La actividad de la reductasa del nitrato como guia de la fertilizacion nitrogenada de cinco especies agrícolas. **Revista Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 1, n. 1, p. 57-63, 1977.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETTO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 239-269.

6 CAPÍTULO 6 – Implicações

Para que a atividade da redutase do nitrato (RN) seja avaliada em plantas de cana-de-açúcar, se faz necessária a padronização das condições de determinação da enzima. Este procedimento foi realizado, como descrito no capítulo 2, a partir de plantas cultivadas em condições de campo, o que definiu um protocolo de análise da enzima em folhas da cultura. Portanto, esta fase do estudo contribuiu no sentido de servir de referência para pesquisadores que desejam utilizar a atividade da RN como variável em seus estudos. No capítulo 3, foi demonstrado como flutua a atividade da enzima em curto prazo após a adubação nitrogenada, com isso, foi possível identificar o momento em que a atividade foi mais alta, o que possibilitou a definição de quando seriam realizadas as coletas dos experimentos descritos nos capítulos 4 e 5. Além disso, é possível que o conhecimento gerado sobre o nível de flutuação da atividade da RN, possa estimular discussões a respeito da prática do parcelamento da adubação nitrogenada na cultura, pois a redução do nitrato só ocorre na presença da enzima, então, supostamente, a segunda aplicação deveria ser realizada no momento da maior atividade enzimática na planta. No capítulo 4, se notou que a atividade da enzima se correlaciona positivamente com o teor de nitrogênio foliar, o que significa que é possível o uso da atividade da enzima como indicadora do estado nutricional do nutriente para a cultura. Ainda no capítulo 4, com a realização do experimento de comparação de cultivares de cana-de-açúcar, foi possível confirmar que o nível de atividade da RN é variável conforme a cultivar, o que se traduz em desafio quanto ao uso da atividade da enzima em um método enzimático alternativo, pois a recomendação de cultivares de cana se altera constantemente. Com a realização da última fase da pesquisa, constatou-se que em plantas deficientes de nitrogênio a dose do nutriente faz com que a atividade da enzima seja alterada, o que indica que futuramente será possível balizar as adubações usando a estimativa da atividade como complemento. A atividade da enzima apresenta boas perspectivas para indicar a nutrição nitrogenada de plantas de cana-de-açúcar, todavia, ainda existe a necessidade do estabelecimento de um critério para o diagnóstico.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Detalhamento das condições de análise da aRN otimizadas por Cazetta e Vilella (2004) para *Brachiaria radicans*

Este pós-texto se faz necessário, uma vez que os passos relatados pelos autores na referida publicação, foram os mesmos adotados nos ensaios iniciais de padronização do método para cana-de-açúcar no presente estudo.

Para proceder-se a análise da aRN em tecidos foliares de *Brachiaria radicans*: Imediatamente após a coleta das plantas, 300 mg de material vegetal, foram colocados em frasco escuro com 10 mL do meio de incubação composto por 2,5 mL de tampão fosfato (KH_2PO_4) 200 mmol dm^{-3} pH 7,4; 2,5 mL de KNO_3 60 mmol dm^{-3} ; 2,5 mL de n-butanol 1% (v/v); 1,0 mL de Triton X-100 0,1% (v/v) e 1,5 mL de água deionizada.

Os frascos foram colocados em um dessecador e submetidos ao vácuo, com uma pressão negativa de 600 mm Hg por um minuto, com posterior reintrodução do ar, repetindo-se este procedimento por três vezes. Em seguida, os frascos foram transferidos para incubação em banho-maria a 30 °C, no escuro, por 60 minutos.

A reação foi então interrompida com adição de 1 mL de solução de sulfanilamida a 1% em HCl 3 mol dm^{-3} . O nitrito produzido, em função da presença da enzima RN foi determinado por uma alíquota de 0,5 mL do meio de incubação, acrescida de 0,5 mL de solução composta por sulfanilamida 10 g dm^{-3} em HCl 3 mol dm^{-3} e 0,5 mL de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,2 g dm^{-3} . A solução foi homogeneizada e após 20 minutos, diluída a 4 mL com água deionizada, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (540 nm).

Para calcular a quantidade de NO_2^- contida na amostra, preparou-se uma curva padrão da mesma forma que a amostra, mas com alíquotas de 0,5 mL de soluções padrão 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de N- NO_2^- , com diluições que variam de 0 a 100 mg dm^{-3} de N- NO_2^- . Essa curva definiu uma equação, por meio da qual foram determinadas as concentrações de nitrito (NO_2^-) na solução. A aRN foi calculada com base na equação da curva de padronização, e foi expressa em micromol de nitrito liberado por grama de massa fresca de tecido foliar, por hora de incubação ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de NO_2^-).

Apêndice 2 – Sequência básica (proposta) para análise da atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em folhas de cana-de-açúcar

Apêndice 2A - Procedimentos

- Coletar a folha +1, (primeira folha de cima para baixo que apresenta o “dewlap” visível).
- Indica-se proceder a coleta mais ou menos por volta das 13 h. Sendo um horário indicado para coletas em dias ensolarados (em dias nublados ou chuvosos o horário de coleta não foi estudado).
- Acondicionar em caixa térmica com gelo, evitando o contato do gelo com os tecidos foliares. Levar imediatamente o material vegetal para o laboratório.
- Dividir a folha em três partes iguais no sentido longitudinal, reservando a parte central (terço médio).
- Retirar com um furador de rolhas, 25 discos foliares (que apresenta massa de aproximadamente 500 mg) ou pesar 500 mg de fragmentos do tecido foliar, sempre excluindo a nervura central.
- Acondicionar o material vegetal (discos ou fragmentos) em um frasco escuro ou coberto, que não permita a entrada de luminosidade (exemplo: tubo de filme).
- Em cada frasco com os tecidos foliares, adiciona-se 10,0 mL de meio de incubação preparado com 2,5 mL de tampão fosfato preparado com KH_2PO_4 na concentração de 285 mmol dm^{-3} com pH 7,3; 2,5 mL de KNO_3 com concentração de 300 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 a 0,6% (v/v) e 4,0 mL de água deionizada (preparar na hora de usar).
- Colocar os frascos em um dessecador (tampas dos frascos entreabertas evitando a luminosidade e possibilitando a retirada de ar). O dessecador deve ser acoplado a uma bomba de vácuo (600 mm Hg) por 3 minutos ininterruptos.
- Fechar a torneira do dessecador, desligar a bomba de vácuo e abrir lentamente a torneira do dessecador permitindo a entrada de ar.
- Vedar os frascos apertando as tampas e transferir para o banho-maria a 32°C , por 90 min, agitando lentamente a cada 15 minutos.

- Após 1 hora e meia, parar a reação adicionando 1 mL de solução de sulfanilamida a 1% diluídas em HCl 3 mol dm⁻³.
- Após suave agitação, retirar 0,5 mL do meio de incubação e transferir para tubos de ensaios com capacidade para 10,0 mL.
- Adicionar 0,5 mL de solução de sulfanilamida a 1% em HCl 3 mol dm⁻³ e 0,5 mL de solução de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,02%.
- Agitar, e deixar em repouso por 20 minutos, depois completar o volume no tubo para 4,0 mL, adicionando 2,5 mL de água deionizada.
- Determinar a absorbância por espectrofotômetro, com comprimento de onda ajustado para 540 nm.
- Preparar uma curva padrão de nitrito (Apêndice 2C)

Apêndice 2B - Preparo dos reagentes

Tampão fosfato (285 mmol dm⁻³ pH 7,25)

- Pesar 19,38 g de KH₂PO₄, dissolver em cerca de 400 mL de água deionizada num béquer.
- Ajustar o pH com NaOH 2 mol dm⁻³ até atingir pH 7,3.
- Transferir para balão volumétrico de 500 mL, completando o volume com água deionizada.

Solução de KNO₃ (300 mmol dm⁻³)

- Pesar 15,5 g de KNO₃ em um béquer, dissolver, transferir para balão de 500 mL e completar o volume com água deionizada.

Solução de Tween 20 a 0,6% (v/v)

Pipetar 0,6 mL de Tween 20 num balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água deionizada (agitar lentamente para não formar espuma e deixar em repouso de um dia para o outro fora da geladeira para completar a dissolução).

Solução de sulfanilamida (1%)

- Preparar 100 mL de HCl 3 mol dm⁻³ (acrescentando 25 mL de HCl fumegante em 75 mL de H₂O deionizada).
 - Pesar 1 g de sulfanilamida e diluí-la nos 100 mL de HCl mol dm⁻³
- Obs. guardar sob refrigeração.

Solução de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,02%

- Pesar 0,02 g de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina e completar para 100 mL com água deionizada.

Obs. Não guardar por mais de quatro meses, pois, ocorre escurecimento gradual, devido à oxidação dos grupos NH₂, o que pode interferir nas leituras de absorbância.

Apêndice 2C - Curva padrão do nitrito

Preparo da solução estoque do nitrito (329 µg mL⁻¹)

- Pesar 0,4926 g de NaNO₂ de boa procedência em um béquer, dissolver com água deionizada, transferir para balão de 1000 mL e completar o volume.

Preparo da solução padrão (1 µg mL⁻¹ de N-NO₂⁻ ou 3,29 µg mL⁻¹ de NO₂⁻)

- Adicionar 1,0 mL da solução estoque em um balão de 100 mL, completar o volume com água deionizada e agitar bem para homogeneizar.

Procedimento

- Numerar 11 tubos de ensaio (repetidos 3 vezes cada), transferir respectivamente alíquotas de 0 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL e 1,0 mL da solução padrão
- Acrescentar 0,5 mL de solução de sulfanilamida a 1% em HCl 3 mol dm⁻³ e 0,5 mL de solução de dicloridrato N-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,02%.
- Agitar para homogeneizar e deixar em repouso por 20 minutos.
- Completar o volume para 4,0 mL adicionando 3 mL; 2,9 mL; 2,8 mL; 2,7 mL; 2,6 mL; 2,5 mL; 2,4 mL; 2,3 mL; 2,2 mL; 2,1 mL e 2,0 mL de água deionizada em cada tubo respectivamente.
- Ler a absorbância no espectrofotômetro a 540 nm.

- Plotar num gráfico de dispersão relacionando as absorbância (eixo Y) e concentrações (eixo X), usar a equação da reta para calcular as concentrações das amostras em função das respectivas absorbâncias.



Apêndice 3 – Vista panorâmica da área cultivada com cana-de-açúcar (IACSP93-3046) utilizada para a padronização do método para a determinação da redutase do nitrato. Área localizada ao lado do Setor de Sericicultura da FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP

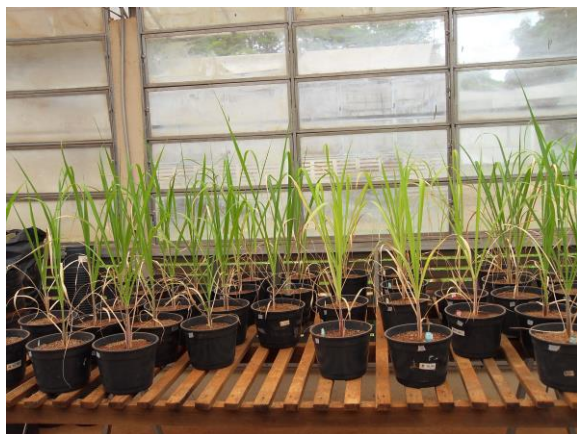
a



b



c



d



Apêndice 4 – Vista geral dos experimentos 1 (A), 2 (B) e 3 (C), descritos no Capítulo 3 e do experimento 1(D) no Capítulo 4

a



b



Apêndice 5 – Vista geral dos experimentos 1 (A) e 2 (B), descritos no Capítulo 5