**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Modificações morfológicas e metabólicas em gramínea e leguminosa
forrageiras tropicais relativas ao suprimento de enxofre**

Fabiana Schmidt

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor
em Ciências. Área de Concentração: Solos e Nutrição
de Plantas.

**Piracicaba
2012**

Fabiana Schmidt
Engenheiro Agrônomo

**Modificações morfológicas e metabólicas em gramínea e leguminosa forrageiras
tropicais relativas ao suprimento de enxofre**

Orientador:
Prof. Dr. **FRANCISCO ANTONIO MONTEIRO**

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em
Ciências. Área de Concentração: Solos e Nutrição de
Plantas.

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Schmidt, Fabiana

Modificações morfológicas e metabólicas em gramínea e leguminosa forrageiras tropicais relativas ao suprimento de enxofre / Fabiana Schmidt.- - Piracicaba, 2012.
162 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Biomassa 2. Enxofre 3. Forragem - Produção 4. Gramíneas forrageiras
5. Glutathione 6. Nutrição vegetal 7. Leguminosas forrageiras I. Título

CDD 633.2
S351m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus amados pais
Antônio Schmidt (*in memoriam*) e Valéria Schmidt,
à minha irmã e amiga **Débora Schmidt,**
à minha avó de coração **Carlota Lozano,**
pelo carinho, incentivo e compreensão

À **Fabiano,**
pelo seu amor sincero, companheirismo e incentivo

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me agraciado com a vida, pelas oportunidades, saúde e por sempre estar me iluminando e guiando em todas as etapas da minha vida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas representado pelos seus mestres pela formação acadêmica e pela acolhida durante o período de doutoramento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no Exterior e pelo apoio financeiro para a execução do projeto.

Ao professor Dr. Francisco Antonio Monteiro, pela orientação e ensinamentos transmitidos e amizade nesses quatro anos e, principalmente, pelas oportunidades e confiança depositadas em mim.

À professora Dr^a Sara de Barros Queiroz Amâncio, pela oportunidade de realização do doutorado-sanduiche na Universidade Técnica de Lisboa, pelas facilidades disponibilizadas para a pesquisa, pelos ensinamentos, além do excelente exemplo profissional.

À professora Dr^a Luísa Cristina Mártires Ferreira Carvalho, pelos conhecimentos transmitidos, paciência e sincera amizade e a pesquisadora Silvia Tavares pela ajuda nos trabalhos realizados.

Ao professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela colaboração na condução de análises deste projeto no Laboratório Genética Bioquímica de Plantas e a Dr^a Salete Aparecida Gaziola, Dr^a Priscila Lupino Gratão, alunos de doutorado Daiana Schmidt, Paula Fabiane Martins, Manuella Dourado e mestrado Monica Franco, Leila Peters, Mariana Cicarelli Cia, Carolina Monteiro pelo auxílio e ensinamentos partilhados.

Ao professor Dr. José Albertino Bendassoli por facilitar a aquisição e as análises dos isótopos estáveis de ³⁴S para a realização deste projeto.

Às funcionárias e grandes amigas do Departamento de Solos: Edinéia S. Mondoni, Lúcia Helena Spessoto Pavan Forti, Lurdes A. D. González, Nivanda M. M. Ruiz e Sueli Bovi pela atenção e apoio dispensados.

Aos colegas de Pós-Graduação, por toda ajuda e companheirismo: Adriana Guirado Artur, Ana Paula Telles, Beatriz Nastaro, Carla Elisa Alves Bastos, Cristiane Prezotto Silveira, Elisângela Dupas, Fabiano Daniel de Bona, Flávio Henrique Silveira Rabêlo, Ioná Rech, Letícia de Abreu, Lucíola Ellen Calió Martins, Márcio Mahmoud Megda, Marcos

Rodrigues, Michele Megda, Roberta Nogueirol, Tiago Barreto Garcez e Wilfrancesco Herrera.

Ao grupo de estagiários da Nutrição Mineral de Plantas e grandes amigos: Andressa Morato Freitas, Alessandra Garbo, Douglas Bottrel, Elisa Mário Gomes, Felipe Furlan, Juliana Benetti, Mariana Kolonko, Rafael Rodrigues Monteiro e em especial Pedro Vítor Ferrari Machado, por toda amizade e apoio durante a condução do experimento.

Aos amigos e colegas que fiz durante o doutorado-sanduiche na Universidade Técnica de Lisboa: Carlos Eduardo Aragón Abreu, João Fernandes, Lucas Coito, Inês Diniz, Patrícia Vidigal e Teresa Pinto.

As minhas amigas Cândida Rodrigues, Cristiane Kreutz, Larissa Varela e Maria Matilde Inácio Felício pelas conversas, passeios, pela companhia e amizade que abrandaram a saudades da família e do Brasil.

As amigas de moradia em Piracicaba Beatriz Nastro, Caroline Pires, Danielle Oliveira, Isabeli Bruno, Karine Genova Campos e Síglea Freitas Chaves pela convivência fraterna.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“Crê em ti mesmo, age e verá os resultados.

Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar”.

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Caracterização das pastagens de <i>Panicum</i>	19
2.2 Caracterização das pastagens de <i>Stylosanthes</i>	19
2.3 Disponibilidade de enxofre nos solos.....	21
2.4 Enxofre na planta.....	21
2.4.1 Absorção, transporte, translocação e assimilação do enxofre na planta.....	22
2.4.2 Concentração e distribuição de enxofre na planta	24
2.4.3 Metabolismo secundário ligado ao enxofre na planta	24
2.4.3.1 Importância e metabolismo da glutatona.....	24
2.5 Alterações metabólicas na planta em função de enxofre.....	26
2.5.1 Absorção de enxofre pelas plantas	26
2.5.2 Síntese de aminoácidos.....	26
2.5.3 Biosíntese da glutatona e atividade das enzimas glutatona redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST).....	27
2.6 O enxofre na produção das plantas forrageiras	28
2.6.1 Gramíneas forrageiras.....	28
2.6.2 Leguminosas forrageiras.....	29
Referências	30
3 APLICAÇÃO DE ENXOFRE ALTERA MORFOLOGIA, CRESCIMENTO E ESTADO NUTRICIONAL DO CAPIM-TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO	39
Resumo	39
Abstract.....	39
3.1 Introdução	40
3.2 Material e métodos	41
3.2.1 Condições de crescimento, disponibilidades de S e delineamento experimental.....	41
3.2.2 Colheita das plantas e avaliações dos parâmetros morfológicos, produtivos e nutricionais das plantas	42
3.2.3 Análise estatística	43
3.3 Resultados.....	43
3.3.1 Morfologia e crescimento da parte aérea.....	43
3.3.2 Morfologia e crescimento do sistema radicular.....	47
3.3.3 Influência da nutrição de enxofre na produção e alocação de biomassa	48
3.3.4 Concentração e acúmulo de enxofre na parte aérea e raízes	50
3.4 Discussões	51
3.5 Conclusões.....	56
Referências	56
4 INTERFERÊNCIA DO SUPRIMENTO DE ENXOFRE NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM CAPIM-TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO.....	61
Resumo	61
Abstract.....	61

4.1 Introdução	62
4.2 Material e métodos	63
4.2.1 Condições de crescimento, tratamentos e delineamento experimental	63
4.2.2 Concentrações de N total, S total, N-nitrato e S-sulfato no tecido vegetal	64
4.2.3 Aminoácidos livres no tecido vegetal	65
4.2.4 Proteínas solúveis no tecido vegetal	66
4.2.5 Análise estatística	66
4.3 Resultados	67
4.3.1 Produção de massa seca e concentrações de S total, S-sulfato, N total e N-nitrato no tecido vegetal	67
4.3.2 Concentrações e distribuição da composição dos aminoácidos livres	70
4.3.3 Proteína solúvel acumulada	72
4.3.4 Relação N:S e produção de forragem	73
4.4 Discussões	74
4.5 Conclusões	77
Referências	77
5 ENXOFRE REGULA A SÍNTESE DE GLUTATIONA E A ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLUTATIONA REDUTASE E GLUTATIONA SULFO-TRANSFERASE EM PLANTAS FORRAGEIRAS	81
Resumo	81
Abstract	81
5.1 Introdução	82
5.2 Material e métodos	83
5.2.1 Condições de crescimento, tratamentos e delineamento experimental	83
5.2.2 Determinações	85
5.2.2.1 Produção de massa seca e concentração de S total e S-sulfato no tecido vegetal	85
5.2.2.2 Concentração de glutathione e atividade enzimática no tecido vegetal	85
5.2.3 Análise estatística	87
5.3. Resultados	87
5.3.1 Produção de massa seca	87
5.3.2 Concentrações de S total, S-sulfato e glutathione total	88
5.3.3 Atividade da glutathione redutase e estado de redução da glutathione	92
5.3.4 Atividade da glutathione sulfo-transferase	95
5.4 Discussões	96
5.5 Conclusões	99
Referências	100
6 O ENXOFRE COORDENA CRESCIMENTO, SÍNTESE DE GLUTATIONA E RESPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM CAPIM TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO	105
Resumo	105
Abstract	105
6.1 Introdução	106
6.2 Material e métodos	107
6.2.1 Obtenção de plantas e condições de crescimento	107

6.2.2 Coleta de plantas e medições de crescimento e produção	108
6.2.3 Extração e determinação de clorofilas.....	109
6.2.4 Extração e determinação de glutatona, ascorbato e H ₂ O ₂	109
6.2.5 Extração protéica e quantificação de atividades enzimáticas	110
6.2.7 Análise estatística	112
6.3. Resultados.....	112
6.3.1 Crescimento das plantas	112
6.3.2 Proteína solúvel e pigmentos cloroplásticos.....	114
6.3.3 Concentrações de peróxidos, ascorbato e glutatona	115
6.3.4 Atividade das enzimas anti-oxidantes SOD, CAT e APX.....	120
6.3.5 Atividade das enzimas chaves do ciclo ascorbato-glutatona GR, DHAR e MDHAR ..	123
6.3.6 Correlações entre índices fisiológicos do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão crescidos sob disponibilidades de S	126
6.4 Discussões	127
6.5 Conclusões.....	132
Referências	132
7 ESTADO NUTRICIONAL EM ENXOFRE AFETA A ABSORÇÃO E A EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE SULFATO EM CAPIM-TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO NO PERÍODO VEGETATIVO.....	139
Resumo	139
Abstract.....	139
7.1 Introdução.....	140
7.2 Material e métodos	141
7.2.1 Ensaios de influxo de ³⁴ S usando a técnica dos isótopos estáveis.....	141
7.2.2 Determinação de S total, S- sulfato e glutatona.	142
7.2.3 Extração de Rna.....	143
7.2.4 Transcrição reversa e análise rt-qPCR do genes que codificam transportadores de sulfato	143
7.2.5 Análise estatística	147
7.3 Resultados.....	147
7.3.1 Crescimento das plantas e estado nutricional em S.....	147
7.3.2 Influência do estado nutricional em S das plantas na absorção de ³⁴ S pelas raízes	149
7.3.3 Influência do estado nutricional em S das plantas na expressão de transportadores de sulfato nas folhas e raízes	151
7.4 Discussões	154
7.5 Conclusões.....	156
Referências	157
8 CONCLUSÕES GERAIS	161

RESUMO

Modificações morfológicas e metabólicas em gramínea e leguminosa forrageiras tropicais relativas ao suprimento de enxofre

O enxofre é um dos elementos essenciais para as plantas e as exigências nutricionais nesse nutriente variam com a espécie e a taxa de crescimento das plantas. Com o objetivo geral de avaliar o efeito da nutrição em enxofre no crescimento e no metabolismo do capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) e do estilosante (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão) desenvolveu-se a presente pesquisa com os objetivos específicos de avaliar os efeitos do fornecimento de enxofre em: i) modificações morfológicas, produtivas e nutricionais ocorridas na parte aérea e nas raízes; ii) metabolismo do nitrogênio e as consequentes alterações na composição e concentrações de aminoácidos; iii) concentrações de enxofre total, enxofre-sulfato e glutatona e na atividade das enzimas glutatona redutase e glutatona sulfo-transferase nas folhas recém-expandidas e raízes; iv) crescimento, metabolismo da glutatona e atividade das enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutatona e v) absorção de sulfato e a expressão de genes de transportadores de sulfato. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e câmara de crescimento, empregando-se soluções nutritivas. As doses de enxofre aplicadas foram ajustadas de modo a permitir nutrição baixa, intermediária e alta em enxofre para cada espécie. O enxofre afetou diretamente na emissão de folhas e de perfilhos, área foliar, comprimento e superfície radicular do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão, aumentando a produção de massa seca da parte aérea e das raízes. A baixa disponibilidade de enxofre ocasionou o desequilíbrio nutricional com o nitrogênio nas plantas, evidenciado por alta relação nitrogênio:enxofre e altas concentrações de nitrato e aminoácidos livres no tecido vegetal. Sob limitação de enxofre, o capim apresentou predomínio de asparagina na composição aminoacídica, enquanto no estilosante ocorreu a predominância de arginina. A aplicação de enxofre aumentou as concentrações de enxofre total, enxofre-sulfato e glutatona nas folhas diagnósticas e raízes para ambas as espécies forrageiras. As plantas crescidas sob limitação de enxofre apresentaram alta atividade da enzima glutatona redutase visando regenerar a glutatona reduzida, que atua protegendo as células contra danos oxidativos decorrentes do estresse da deficiência nutricional. O fornecimento de enxofre aumentou a atividade da glutatona sulfo-transferase incrementando a capacidade do vegetal de suportar estresses ambientais. A baixa disponibilidade de enxofre induziu o aumento da atividade de enzimas antioxidantes que atuam na regeneração da glutatona e do ascorbato na forma reduzida. As plantas crescidas em baixa disponibilidade de enxofre apresentaram aumento da concentração de glutatona e maior alocação desse composto nas raízes. A distribuição de glutatona das folhas para as raízes em condição de limitação de enxofre regula a absorção de sulfato no capim e no estilosante de modo diferenciado. Para o capim com alta concentração de glutatona nas raízes decresce o influxo total de ^{34}S , enquanto para o estilosante não ocasiona a redução da absorção de sulfato.

Palavras-chave: Alocação de biomassa; Ciclo ascorbato-glutatona; Composição aminoacídica; Forrageiras tropicais; Glutatona; Nutrição de enxofre; Produção de forragem; Transportadores de sulfato

ABSTRACT

Metabolic and morphological changes in grass and legume tropical forages related to sulfur supply

Sulfur is an essential element required by plants and the nutritional requirements in this nutrient vary according to species and plant growth rate. This research had the main objective of evaluating the effect of sulfur nutrition on growth and metabolism of Guinea grass (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) and stylo (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão) and was developed with the specific objectives to determine the effects on i) morphological, productive and nutritional changes in plant shoots and roots, ii) nitrogen metabolism and the changes in the composition and concentrations of amino acids, iii) concentrations of total sulfur, sulfur-sulfate and glutathione and the activity of the enzymes glutathione reductase and glutathione sulfo-transferase in recently expanded leaves and roots, iv) growth, glutathione metabolism and activity of enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle and v) sulfate uptake and expression of sulfur transporters genes. The experiments were carried out in greenhouse and growth chamber, by using nutrient solutions. Sulfur supply were adjusted to low, intermediate and high S nutrition for each species. Sulfur supply influences the emission of leaves, tillering, leaf area, root length and surface of Guinea grass and stylo increasing production of dry mass of aboveground and roots. Sulfur limitation alters the distribution of photosynthates between aboveground and roots of Guinea grass and stylo providing reduction in dry matter production of roots. The plants of Guinea grass increase root surface as a mechanism for adaptation to limited S in the culture medium. The relative chlorophyll index (RCI) in the recently expanded leaves relates to the production of dry mass of aboveground and can be used to assess S nutritional status in Guinea grass and stylo. The application of S proves necessary to increase production of dry mass in Guinea grass and stylo. Low S availability caused nutritional imbalance with N in Guinea grass and stylo plants, as shown by a high N:S ratio and high concentrations of N-nitrate and free amino acids in plant tissues. Among amino acids, asparagine predominated in S-limited guineagrass and arginine in S-limited stylo. Increased S supply regulates N:S ratio at values close to 20:1, which provides N and S concentrations that are more suitable for protein synthesis and forage production in plants of both species. Adding S increased concentrations of total S, S-sulfate, and glutathione in diagnostic leaves and roots of both species collected at the two harvests. Plants grown under S limitation showed high levels of GR activity, related to the regeneration of GSH, which acts to protect cells against oxidative damage caused by the stress of nutritional deficiency. S supply increased GST activity, and consequently plants' capacity to withstand environmental stresses. Low S availability increased activity of the antioxidant enzymes that act in the regeneration of GSH and AsA. Plants grown with low S availability showed higher concentration of glutathione and greater allocation of glutathione to roots. For Guinea grass, high glutathione concentrations in roots decrease the ^{34}S uptake. For stylo not cause reduction of ^{34}S uptake.

Keywords: Amino acid composition; Biomass allocation; Cycle ascorbate-glutathione; Forages production; Glutathione; Sulfate transporters; Sulfur nutrition; Tropical forages

1 INTRODUÇÃO

As pastagens são de grande importância para a economia no Brasil, pois são a base alimentar para a bovinocultura, ovinocultura, caprinocultura e equideocultura e ocupam extensas áreas do território brasileiro. A maioria das pastagens cultivadas no Brasil é constituída essencialmente por plantas da família botânica Poaceae (Gramineae). Dentre as gramíneas tropicais estabelecidas por sementes, destacam-se as espécies e cultivares pertencentes aos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*. As leguminosas forrageiras tropicais são utilizadas principalmente em consorciação, que consiste na presença de gramíneas e leguminosas numa mesma área, estando entre as espécies usadas nessa consorciação as dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. A manutenção das plantas forrageiras em consórcio exige a seleção de espécies de gramíneas e leguminosas compatíveis, adaptadas às condições edafoclimáticas de cada região, bem nutridas e manejadas adequadamente.

O atendimento do requerimento nutricional das plantas forrageiras é um importante requisito para a produção de forragem em quantidade e com adequado valor nutritivo. O enxofre (S) é um dos macronutrientes encontrados em menores concentrações no tecido vegetal das plantas. No entanto, por participar de várias rotas metabólicas primárias e secundárias e por regular o metabolismo do nitrogênio (N), a sua disponibilidade pode alterar a produção de massa seca e aspectos do valor nutricional da forragem, como consequência de modificações no metabolismo do S na planta. Considerando os aspectos do valor nutricional da forragem, o S é um dos precursores do antioxidante glutathiona (GSH) cujo papel na nutrição vegetal, animal e humana tem despertado o interesse de pesquisadores das mais diversas áreas do conhecimento. Pelo fato do S fazer parte da constituição química desse tripeptídeo, o suprimento desse elemento ao solo pode influenciar as concentrações desse metabólito secundário na planta. A glutathiona é a maior reserva não-protéica de S reduzido nas plantas, a qual pode regular a alocação de S entre os órgãos das plantas e atuar como poderoso agente antioxidante extremamente benéfico no combate aos estresses bióticos e abióticos que afetam as plantas.

A glutathiona pode atuar diretamente na remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e por via enzimática no ciclo ascorbato-glutathiona, que é o principal modo de ação da GSH no combate aos radicais livres, o qual possibilita a regeneração do ascorbato reduzido (AsA), outro antioxidante muito importante nas células das plantas, especialmente na detoxificação de H_2O_2 . A concentração de GSH no tecido vegetal é determinante da atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) e glutathiona sulfo-transferase (GST). A GR e a GST são

responsáveis, em parte, pelo potencial antioxidante e de detoxificação da célula vegetal, respectivamente.

As hipóteses testadas neste estudo foram: i) em condições de oferta limitada de S, as plantas forrageiras podem apresentar mecanismos de adaptação que atuam desde a regulação da absorção e assimilação do nutriente até a modificação da forma de crescimento de modo a otimizar a oferta e a demanda de S no interior da planta; ii) a disponibilidade de S afeta os metabolismos do S e do N e alterações nos aminoácidos essenciais e/ou acúmulo de produtos secundários das rotas assimilatórias de N e de S, que podem interferir no valor nutricional e na produção de massa seca da forragem; iii) o suprimento de S às espécies forrageiras pode aumentar a concentração do substrato glutatona, alterando a atividade das enzimas GR e GST e o funcionamento do ciclo ascorbato-glutatona, o que pode se refletir na produção de massa seca, valor nutricional das plantas e na capacidade de combater estresses bióticos e abióticos que afetam as plantas e iv) o fornecimento de S na forma reduzida a partir das folhas para as raízes pode influenciar a absorção de S pelas raízes para satisfazer a demanda de S nos tecidos em crescimento.

Com o objetivo geral de avaliar o efeito da nutrição com S no crescimento e no metabolismo de gramínea e leguminosa forrageiras e suas implicações na produção de massa, aspectos do valor nutritivo da forragem e capacidade antioxidativa das plantas desenvolveu-se a presente pesquisa com os objetivos específicos de: i) identificar e quantificar as modificações morfológicas, produtivas e nutricionais ocorridas na parte aérea e nas raízes de *Panicum maximum* cv. Tanzânia e *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão em função da disponibilidade de S; ii) avaliar o efeito do S no metabolismo do N e as consequentes alterações na composição e concentrações de aminoácidos solúveis nesse capim e nessa leguminosa em condições de suprimento nutricional baixo, intermediário e alto de S; iii) avaliar os efeitos do S nas concentrações de S total, S-sulfato e glutatona e na atividade das enzimas GR e GST nas folhas recém-expandidas e raízes dessas duas espécies de plantas forrageiras tropicais nas fases de estabelecimento e de rebrotação; iv) investigar o efeito da disponibilidade do S no crescimento, no metabolismo da glutatona e na atividade das enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutatona dessas espécies forrageiras e v) avaliar a absorção e a expressão de genes de transportadores de sulfato em plantas dessa gramínea e dessa leguminosa forrageiras crescidas em condições de limitação e suficiência de S.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização do *Panicum*

As plantas do gênero *Panicum* pertencem à família *Poaceae* e a tribo *Paniceae* possui cerca de 80 gêneros e 1460 espécies. A espécie *Panicum maximum* tem seu centro de origem na África tropical (JANK, 1995). As plantas de *Panicum maximum* cv. Tanzânia foram coletadas pelos franceses do *Office de la Recherche Scientifique et Technique d' Outre-Mer* (ORSTOM) em 1969, na Tanzânia, foram identificadas como ORSTOM T58 e introduzidas no Brasil em 1984, com o germoplasma recebendo o registro de BRA-007218. Em 1991, o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) da Embrapa lançou comercialmente o cultivar Tanzânia-1 (JANK et al., 2010).

As pastagens formadas por plantas do gênero *Panicum* caracterizam-se pelo expressivo potencial de produção de massa seca e extração de nutrientes do solo. O metabolismo fisiológico C4 confere a essas plantas alta eficiência no uso da radiação solar e elementos essenciais presentes no solo. Diversas espécies e variedades de *Panicum* são utilizadas para compor os pastos, as quais diferem em relação às exigências nutricionais, resistência a pragas, adaptação ao manejo, disponibilidade de água, tolerância à acidez do solo e produção de forragem.

Dentre as gramíneas difundidas no Brasil está o *Panicum maximum* cv. Tanzânia, o capim-tanzânia, o qual é utilizado devido ao seu elevado valor nutritivo e alimentício, elevada resposta à adubação, resistência moderada à cigarrinha das pastagens, manejo fácil quanto à uniformidade de pastejo, e maior relação folha:haste, e são caracterizadas por serem exigentes em fertilidade do solo (MACHADO et al., 1998; REGO, 2001). O capim-tanzânia é uma planta cespitosa, com altura média de 1,30 m (quando em crescimento livre), folhas decumbentes com largura média de 2,6 cm, ausência de pilosidade e os colmos são levemente arroxeados. As inflorescências são do tipo panícula.

2.2 Caracterização do *Stylosanthes*

As plantas do gênero *Stylosanthes* pertencem à família *Fabaceae*, também conhecida como *Leguminosae* e a tribo *Aeschynomeneae*. O gênero é constituído por subarbustos eretos, semi-eretos ou prostrados, perenes ou anuais, de inflorescências variadas e com flores amarelas, alaranjadas ou brancas. Uma característica típica dessa família é a ocorrência do fruto do tipo legume, também conhecido como vagem (exclusivo desse grupo). Uma

característica ecológica importante da família é a simbiose de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* e semelhantes, que fixam o nitrogênio da atmosfera.

O *Stylosanthes* Sw. possui 45 espécies distribuídas no sudeste da Ásia, na África tropical e nas Américas (TARAWALI et al., 1997). O principal centro de origem e diversidade do gênero é o Brasil, com ocorrência de 25 espécies (LEWIS; MACKINDER; LOCK, 2005) e muitas dessas são usadas como forrageiras em pastagens ou como adubação verde. A pesquisa com estilosante no Brasil foi iniciada na década de 1940 e são encontrados registros sobre o potencial forrageiro de espécies nativas (OTERO, 1952). O gênero é considerado um dos mais importantes dentro da família *Fabaceae*, para a formação de pastos em regiões tropicais, principalmente com as espécies *S. capitata*, *S. guianensis*, *S. hamata*, *S. fruticosa*, *S. humilis*, *S. macrocephala*, *S. scabra*, *S. leiocarpa*, *S. viscosa* e *S. sympodialis*.

Determinadas espécies forrageiras do gênero *Stylosanthes* destacam-se entre as leguminosas tropicais por sua elevada capacidade produtiva, rusticidade, qualidade nutricional, adaptação a variadas condições climáticas, tolerâncias à seca, ao excesso de alumínio e ao pastejo intenso e capacidade de recuperação de solos degradados, especialmente quanto à fixação de nitrogênio (STACE; EDYE, 1984; ANDRADE; KARIA, 2000; ANDRADE; KARIA; RAMOS, 2004).

O *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão provém de uma coleta no ano de 1979, em Minas Gerais feita pelo pesquisador Nuno Maria de Souza Costa. Recebeu os números de introdução EPAMIG 1060 e CPAC1230 e registro pela EMBRAPA/CENARGEN sob o código de acesso BRA 017817. Foi introduzido em 1979 no Banco Ativo de Germoplasma do Centro de Pesquisa Agropecuária Cerrados-CPAC e desde então vem sendo avaliado. A partir de 1980, suas sementes começaram a ser multiplicadas para trabalhos de avaliação no CPAC e em outras instituições de pesquisa. No Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte- CNPGC, tem sido avaliado desde 1983, e em 1993 foi realizado o seu lançamento comercial pela Embrapa Cerrados e Embrapa Gado de Corte.

O cultivar Mineirão é perene, semi ereto, podendo atingir 2,5 m de altura, no seu segundo ano de livre crescimento. Tem caules grossos na base e pilosos no final das hastes, possui folíolos lanceolados medindo de 2,0 a 5,0 cm de comprimento e 0,4 a 0,8 cm de largura, com 5 a 7 pares de nervuras. Os ramos e folhas possuem viscosidade que se acentua na seca e pode dificultar a colheita mecanizada de sementes. A inflorescência é múltipla e capitada (roseta).

É uma leguminosa forrageira com excelente adaptação a solos de baixa fertilidade e apresenta excelente resistência à seca. Essas duas características tornam o estilosante

Mineirão uma das melhores leguminosas disponíveis no mercado para suplementação de proteína do gado no período seco do ano. O uso do cultivar Mineirão como banco de proteína ou em pastagens consorciadas impede que o gado de corte tenha perda de peso. Essa técnica permite redução de custos de alimentação de rebanhos de corte, de leite, de caprinos e ovinos durante a seca e pode ser usada tanto na agricultura familiar quanto na empresarial. No entanto, a utilização de *Stylosanthes* de forma comercial vêm sendo limitada, principalmente em razão da susceptibilidade da maioria dos cultivares à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), aliada à baixa produtividade de sementes (ANDRADE; KARIA; RAMOS, 2004).

2.3 Disponibilidade de enxofre nos solos

Grandes áreas do planeta apresentam solos com deficiência de S, especialmente os mais intemperizados, como os Latossolos (Oxisols) e Argissolos (Ultisols). Entretanto, sua deficiência no cultivo de plantas manifestou-se quando se procurou obter elevadas produtividades com o uso de corretivos e fertilizantes. O uso de resíduos orgânicos e de fertilizantes fontes de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) ricos em S mascarou esta deficiência até que se passou a utilizar fertilizantes NPK concentrados. Além disso, o baixo retorno de S com o estrume dos animais, a prática da agricultura intensiva com o cultivo de variedades de alto rendimento, o declínio do uso de fungicidas contendo S e a redução na emissão atmosférica de S também colaboraram para afetar a produção e qualidade das culturas devido à oferta insuficiente de S (SCHERER, 2001).

O S ocorre no solo em formas orgânicas e inorgânicas. A participação dessas duas formas varia de acordo com as condições de solo, como o pH, drenagem, composição mineralógica, teor de matéria orgânica, quantidade e qualidade de resíduos orgânicos incorporados e profundidade do perfil do solo. Normalmente, a quase totalidade do S nos ecossistemas naturais ou sob cultivo encontra-se na forma orgânica, constituindo uma importante reserva deste nutriente, especialmente em solos mais intemperizados (BOHN et al, 1986). Schmidt et al. (2012), estudando a dinâmica e distribuição das frações orgânicas do S em solo (Entisol) cultivado por oito anos com pastagem tropical (*Brachiaria decumbens*), observaram que o S na forma orgânica representa de 97% até 99% do S total em solos cultivados com pastagens tropicais. Dentre as frações orgânicas de S, o S residual foi o mais abundante (variando entre 42 e 67% do S total), seguido da fração S-éster (19 até 42%) e do S ligado ao carbono (11 até 19%).

O íon sulfato é a forma na solução do solo absorvida pelas plantas. A disponibilidade de S, entretanto, depende dos processos de adsorção/dessorção, mineralização/imobilização, efeitos influenciados pelas raízes das plantas, lixiviação, entre outros. Em razão desses processos, o sulfato poderá se encontrar no solo em variados graus de disponibilidade para as plantas e o equilíbrio de suas formas disponíveis é resultante da dinâmica destas formas no solo. A disponibilidade de S em termos físico-químicos pode ser explicada pela inter-relação entre os fatores: intensidade, quantidade (reserva lábil) e capacidade tampão. Em adição a essas formas de S, existe a reserva não-lábil, que são formas de S fortemente retidas em frações orgânicas e inorgânicas do solo e que não se encontram, em curto prazo, em equilíbrio com o S da solução (ALVAREZ et al., 2007).

2.4 Enxofre na planta

2.4.1 Absorção, transporte, translocação e assimilação do enxofre na planta

O íon sulfato é a principal forma de S absorvido pelas plantas e é também a forma predominantemente encontrada nos solos. O S também pode ser absorvido pelas folhas tanto na forma oxidada (SO_2) quanto na reduzida (H_2S). O dióxido de S (SO_2) e outros gases sulfurosos como o sulfeto de hidrogênio (H_2S), sulfeto de carbonila (COS), dissulfeto de carbono (CS_2), sulfeto de dimetila (CH_3SCH_3 , DMS) e metil-mercaptano (CH_3SH) podem ser absorvidos nas folhas, principalmente via estômato.

A absorção de S é um processo ativo dependente de consumo de energia. A absorção do sulfato nas raízes apresenta cotransportadores H^+ de alta afinidade, com a expressão dos respectivos genes sendo fortemente induzida pela deficiência de enxofre. Os transportadores de baixa afinidade estão envolvidos na distribuição do sulfato entre as células através das membranas plasmáticas e no armazenamento e remobilização de sulfato dos vacúolos através do tonoplasto. Para os transportadores que entregam o sulfato nos cloroplastos, o local de ativação e de redução ainda são desconhecidos (HAWKESFORD et al., 2012).

O sulfato absorvido é translocado pelo xilema em direção às folhas. O transporte de sulfato pode ocorrer via xilema ou via floema, podendo redistribuir-se entre essas vias (LARSSON et al., 1991). O sulfato que chega às folhas é reduzido e incorporado em esqueletos carbônicos. Compostos com S reduzido podem ser translocados em direção às folhas em crescimento ou em direção aos ramos, ao caule ou às raízes (HERSCHBACH e RENNENBERG, 1995). As raízes são amplamente dependentes da translocação via floema para aquisição de aminoácidos que contêm S.

A transferência de sulfato e de compostos com S reduzido entre xilema e o floema é fundamental para a translocação e redistribuição de S, em razão de ser este elemento retido, com maior intensidade em folhas velhas. A principal forma de S reduzido translocada via floema é a glutathione (HERSCHBACH e RENNENBERG, 2001).

A assimilação do sulfato absorvido pelas raízes das plantas exige alto gasto energético pelas células no processo de redução do referido ânion até a incorporação no aminoácido cisteína (HELL, 1997), o qual é o primeiro composto orgânico com S sintetizado pela planta (CRAWFORD et al., 2000). Nas plantas superiores, a primeira etapa da assimilação do S é a ativação do sulfato pelo ATP. Nesta reação, a enzima ATP sulfurilase catalisa a substituição de dois grupos fosfato do ATP pelo grupo sulfurilo, formando a adenosina fosfosulfato (APS) e pirofosfato. Esta enzima é regulada por vários fatores externos (ex. luz) e internos (ex. compostos reduzidos de S). O sulfato na forma ativada, como adenosina fosfosulfato (APS), pode atuar como substrato para a síntese de ésteres de sulfato ou redução de sulfato. Para a síntese de ésteres de sulfato, tais como os sulfolípidos, a enzima APS quinase catalisa a formação de fosfoadenina fosfosulfato (PAPS) em reação dependente de ATP. De PAPS, o sulfato ativado pode ser transferido para um grupo hidroxila formando éster sulfato.

Para a redução completa do sulfato, o sulfato ativado (APS) é reduzido a sulfito (SO_3^{2-}) pela APS redutase (também conhecida como APS sulfotransferase) exigindo dois elétrons provenientes da glutathione. Subsequentemente, seis elétrons da ferredoxina são necessários para produzir sulfeto (S^{2-}) numa reação catalisada pela sulfito redutase, a qual ocorre somente nos cloroplastos. O sulfeto recém-formado é transferido para O-acetilserina pela enzima O-acetilserina (tiol) liase (OASTL). O substrato O-acetilserina é sintetizado a partir de serina e acetil coenzima A, em reação catalizada pela enzima serina acetiltransferase (SAT). Portanto, o esqueleto de carbono e o nitrogênio presentes na cisteína são originários da serina, a qual é produzida pela fotorrespiração (KOPRIVA; RENNENBERG, 2004). A provisão da serina é dependente de adequado suprimento de carbono (C) e nitrogênio (N), e esse ponto de convergência representa a união das rotas metabólicas de assimilação do N e C em coordenação com a rota metabólica de assimilação do S (HAWKESFORD, 2000).

O sulfeto é incorporado na O-acetilserina, formando o aminoácido cisteína. A cisteína pode ser direcionada diretamente para a síntese de proteínas ou ser metabolizada para cistina, metionina, coenzimas ou glutathione.

2.4.2 Concentração e distribuição de enxofre na planta

A concentração do S é muito variável entre espécies de plantas e também depende de fatores externos como a disponibilidade do elemento no solo. A concentração média de S nas plantas com adequado crescimento e desenvolvimento varia entre 1 e 5 g kg⁻¹. Considerando as famílias de plantas, os requerimentos nutricionais relacionados a S aumentam na ordem: Poaceae (Gramineae) < Leguminosae < Cruciferae (HAWKESFORD et al., 2012).

O S-sulfato absorvido pelo sistema radicular é transportado para ser reduzido nas folhas das plantas (HELL; RENNENBERG, 1998). Quando em excesso na planta, o S-sulfato pode ser armazenado nos vacúolos das células das raízes e/ou folhas. No caso de deficiência, a ordem de utilização do S-sulfato armazenado nas células é a seguinte: raízes > folhas novas > folhas velhas (PROSSER et al., 2001). A remobilização de S-sulfato dos vacúolos celulares é um processo lento (HAWKESFORD, 2000). Estudos com soja (*Glycine max*) demonstraram que a remobilização de S de folhas maduras é acelerado pela proteólise induzida por deficiência de N (SUNARPI; ANDERSON, 1997).

Análogo ao S-sulfato, outra forma de armazenamento e transporte de S na planta é a glutathiona (GSH + GSSG). A glutathiona se distribui no sistema radicular e na parte aérea, podendo ser transportada tanto no xilema quanto no floema (HELL e RENNENBERG, 1998). As concentrações da GSH e da GSSG são parcialmente dependentes do estado de estresse, da atividade da GR e do estado nutricional da planta com relação ao S (NOCTOR et al., 1998).

2.4.3 Metabolismo secundário ligado ao enxofre na planta

2.4.3.1 Importância e metabolismo da glutathiona

A glutathiona e seus homólogos compreendem um grupo de tripeptídeos formados pelos aminoácidos glutamato (ácido glutâmico), cisteína e glicina. No processo da síntese de glutathiona existem dois pontos dependentes de ATP, no qual a cisteína e glutamato são primeiramente convertidos em γ -glutamilcisteína (γ -EC) em reação catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase (γ -ECS). O segundo ponto é a adição da glicina na γ -glutamilcisteína pela glutathiona sintetase (GSH-S) para a formação da glutathiona. O metabólito glutathiona pode existir na forma reduzida (GSH) ou na forma oxidada (GSSG), sendo que nesta última duas glutathionas são ligadas por uma ponte de dissulfeto (ROUHIER; LEMAIRE; JACQUOT, 2008). Diversas funções são atribuídas à glutathiona no metabolismo vegetal, destacando-se: transporte e estoque de S reduzido, regulação da nutrição em S, antioxidante e co-substrato em reações enzimáticas, regulação da atividade de diversas

enzimas, transporte de hormônios e agente detoxificante de xenobióticos e metais pesados (RENNENBERG, 2001).

A GSH é caracterizada como poderoso agente antioxidante (WONISCH; SCHAUR, 2001; CARETTO et al., 2002; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; DROUX, 2004) e extremamente benéfica no combate aos estresses bióticos e abióticos (NOCTOR; FOYER, 1998; GRILL; TAUSZ; DE KOK, 2001) que afetam as plantas. O principal modo de ação da GSH no combate aos radicais livres está ligado ao ciclo do ascorbato-glutationa, o qual remove peróxido de hidrogênio (H_2O_2) da célula vegetal (NOCTOR; FOYER, 1998; NOCTOR et al., 1998). No ciclo do ascorbato-glutationa, a GSH é utilizada como substrato, o que promove a sua oxidação e formação de GSSG. A enzima glutatona redutase (GR) é responsável pela reciclagem do GSH a partir da GSSG, sendo primordial para manter a capacidade antioxidante e de detoxificação da célula (FOYER et al., 1995). A razão entre GSH e GSSG na célula vegetal reflete o potencial de defesa da planta contra estresses oxidativos, ou seja, quanto mais elevada a GSH:GSSG, maior a capacidade da planta de promover a detoxificação de radicais livres (H_2O_2), sendo o valor 0,9 considerado como normal para plantas sob condições de não-estresse (NOCTOR et al., 1998). Por governar a concentração das formas GSH e GSSG, a atividade da GR também é indicativa do estado de estresse da planta e da resistência da planta ao estresse oxidativo (NOCTOR; FOYER, 1998; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

Além da GR, outra enzima importante envolvida na defesa da planta contra estresses é a glutatona sulfo-transferase (GST) (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; ROUHIER; LEMAIRE; JACQUOT, 2008). O mecanismo de ação dessa enzima envolve o uso da GSH como doadora de tiol para a GST, que catalisa a conjugação da forma reduzida de glutatona com produtos endógenos causadores de danos oxidativos às células vegetais, tais como: radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídeos de membranas e produtos de degradação oxidativa de DNA (DIXON; DAVIS; EDWARDS, 2002). A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da GSH com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, mediada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, o que facilita a excreção e diminuição da toxicidade (LAM; SPARNINS; WATTERBERG, 1982). Nesse caso, a GSH também atua como substrato para a enzima GST, o que pode regular parcialmente a concentração desse metabólito na planta (LAMOUREX; RUSNESS, 1989).

2.5 Alterações metabólicas na planta em função de enxofre

2.5.1 Absorção de enxofre pelas plantas

A absorção de S parece ser dependente da espécie, do requerimento nutricional e do estado nutricional da planta em relação ao S (CLARKSON; DIOGO; AMÂNCIO, 1999; GIORDANO; PEZZONI; HELL, 2000; PROSSER et al., 2001). Considerando o metabolismo do S na planta, aparentemente plantas deficientes em S aumentam a capacidade de absorção de sulfato, enquanto que plantas com altas concentrações de cisteína e GSH exibem redução na taxa de absorção do referido nutriente (BUCHNER; TAKAHASHI; HAWKESFORD, 2004).

Trabalhando com espinafre (*Spinaceae oleraceae*), Prosser et al. (2001) verificaram incrementos na taxa de absorção de S pelas plantas, inversamente proporcionais ao tempo em que ficaram sem S no meio de cultivo. Essa plasticidade fisiológica para aumentar ou diminuir a capacidade de absorção de S, de acordo com o excesso ou falta do nutriente (HAWKESFORD; DE KOK, 2006), é atribuída à regulação dos transportadores de sulfato na membrana plasmática das raízes das plantas (MARUYAMA-NAKASHITA et al., 2004). No entanto, a resposta das plantas é dependente da espécie vegetal, sendo o fator preponderante a exigência nutricional relacionada ao elemento.

A influência da concentração da GSH no controle da absorção de S-sulfato pela planta ainda não é consenso entre os pesquisadores. Diversos trabalhos demonstram que o acúmulo da GSH regula negativamente a absorção de S pela planta (HERSCHBACH; RENNENBERG, 1991; HERSCHBACH; RENNENBERG, 1994; LAPPARTIENT et al., 1999; MARUYAMA-NAKASHITA et al., 2004; ROUACHED et al., 2008), enquanto outros apontam que o aumento da GSH incrementa a taxa de absorção de sulfato pelas raízes do vegetal (SMITH et al., 1985; KOCSY et al., 1996).

2.5.2 Síntese de aminoácidos

A deficiência de S se manifesta na redução da concentração dos aminoácidos com S da planta (cisteína e metionina) e no acúmulo de uma série de outros aminoácidos, cuja especificação parece ser dependente da espécie vegetal. Estudos envolvendo as gramíneas temperadas azevém (*Lolium perenne*) e cevada (*Hordeum vulgare*) mostraram que a deficiência de S resultou no acúmulo dos aminoácidos asparagina e ácido aspártico no tecido vegetal (BOLTON; NOWAKOWSKI; LAZARUS, 1976; COWLING; BRISTOW, 1979; MILLARD; SAHARP; SCOTT, 1985; KARMOKER et al., 1991). No entanto, espécies como

Nicotiana tabacum, *Spinaceae oleracea* e *Beta vulgaris* mostraram incrementos expressivos na concentração do aminoácido arginina, quando crescidas em meio limitante em S (MIGGE et al., 2000; THOMAS et al., 2000; PROSSER et al., 2001). Experimentos com as plantas-modelo *Arabidopsis thaliana*, privadas de S no meio de cultivo, demonstraram aumento na concentração dos aminoácidos serina e O-acetilserina (NIKIFOROVA et al., 2006). Outros autores relataram também que a deficiência de S resultou em incremento nas concentrações de outros aminoácidos, tais como: glutamina, alanina e glicina (COWLING e BRISTOW, 1979; MIGGE et al., 2000; THOMAS et al., 2000; NIKIFOROVA et al., 2006).

No caso das gramíneas e leguminosas forrageiras tropicais, o conhecimento de quais aminoácidos são alterados pela limitação de S ganha importância, pois concentrações subótimas de aminoácidos essenciais diminuem o valor nutritivo da forragem.

2.5.3 Biosíntese da glutathione e atividade das enzimas glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST)

A GSH merece destaque na nutrição mineral de plantas pois sua biossíntese e concentração no tecido vegetal estão diretamente relacionadas à absorção e metabolismo do nutriente S (DE KOK et al., 1981; LAPPARTIENT et al., 1999; HELL; HILLEBRAND, 2001; KOPRIVA; RENNENBERG, 2004). Como a síntese da GSH depende do suprimento do aminoácido cisteína (NOCTOR et al., 1998; NOCTOR et al., 2002; KOPRIVA; RENNENBERG, 2004), a deficiência nutricional de S prejudica a síntese desse aminoácido e pode reduzir a concentração de GSH no tecido vegetal.

De Kok et al. (1981), trabalhando com espinafre, constataram aumentos na concentração da GSH devido ao suprimento de sulfato no meio de incubação. Por outro lado, Foyer e Noctor (2001) relataram que a síntese da glutathione é induzida em condições de estresse nutricional, como mecanismo de proteção contra danos oxidativos, o que explica o aumento da concentração de glutathione nas folhas de plantas carentes em S. Estudos de Rennenberg, Schmitz e Bergman (1979) e Rennenberg (1984, 1995) mostraram que a glutathione é a forma tiólica predominantemente translocada via floema, de folhas expandidas para as raízes, quando há demanda de S e também em condições de estresse.

Como a GSH atua como substrato e/ou está diretamente ligada a ação das enzimas GR e GST (NOCTOR et al., 1998), as alterações que ocorrem na concentração da GSH tendem a se refletir na atividade das referidas enzimas.

2.6 O enxofre na produção das plantas forrageiras

2.6.1 Gramíneas forrageiras

O S tem destacada contribuição no incremento da produção das gramíneas forrageiras tropicais, especialmente em regiões com solos intemperizados e/ou com baixo teor de SO_2 na atmosfera. O efeito benéfico da aplicação do S para a produção de capins foi verificado por diversos autores. Santos (1997) mostrou a resposta na produção de parte aérea e raízes de *Brachiaria decumbens* ao suprimento de S, Dynia e Cunha (1984) verificaram respostas ao S na *Brachiaria humidicola*, Lima et al. (2000) mostraram que a falta de adubação com S limitou o crescimento de *Brachiaria brizantha* e Morikawa et al. (1998) demonstraram respostas expressivas ao fornecimento de S para a *Brachiaria brizantha*. Monteiro e Carriel (1987) verificaram respostas significativas à aplicação de S para a produção de massa seca do *Panicum maximum*. Ferrari Neto (1991) verificou que, em condições de omissão de S, para o desenvolvimento do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e do capim-colonião (*Panicum maximum* cv. Colonião), essas forrageiras apresentaram redução de 30 e 41% na produção de massa seca da parte aérea, no total de dois cortes. Lavres Jr., Monteiro e Schiavuzzo (2008) observaram aumento no número de perfilhos, na produção de massa seca da parte aérea e das raízes, nos índices relativos de clorofila (unidades SPAD) e nas concentrações de S na parte aérea e raízes do capim-marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu).

A não inclusão do S na adubação também tem resultado em concentrações muito baixas desse elemento em várias gramíneas forrageiras. Ferrari Neto (1991) verificou concentrações de S de 0,4 e 0,6 g kg⁻¹ para o capim-colonião e 0,2 e 0,4 g kg⁻¹ para o capim-braquiária quando não efetuou a aplicação de S. Faquin et al. (1995) obtiveram concentrações de S de 0,3 g kg⁻¹ em capim-marandu e 0,6 g kg⁻¹ em capim-andropogon (*Andropogon gayanus* cv. Planaltina) na ausência de adubação com S. Faquin et al. (2000) reportaram que a concentração de S entre 0,4 e 0,5 g kg⁻¹ no capim-marandu foi acompanhada de sintomas de deficiência no capim cultivado sem a aplicação de S.

A adubação com S isoladamente promove respostas positivas na produção de diversas espécies de capins. Além disso, pesquisas têm demonstrado a relevância do uso do S simultaneamente ao N na adubação das pastagens para aumentar e sustentar a produção de massa seca das plantas forrageiras (BROWN et al., 2000; KOWALENKO, 2004; KALMBACHER et al., 2005; MATHOT et al., 2008; BATISTA e MONTEIRO, 2008; DE BONA, 2009). Kalmbacher et al. (2005), estudando a resposta do capim-pensacola (*Paspalum notatum*) à adubação combinada de quatro doses de N (0 a 255 kg ha⁻¹ ano⁻¹) e quatro doses

de S (0 a 40 kg ha⁻¹ ano⁻¹), verificaram aumento na produção de massa seca, na concentração de N na planta e no N recuperado com o incremento nas doses de S.

2.6.2 Leguminosas forrageiras

As exigências nutricionais das leguminosas forrageiras em S, para atingir produções satisfatórias, são superiores às das gramíneas (WERNER, 1984). O aumento do N disponível devido à eficiência da fixação biológica de N atmosférico pela associação simbiótica estabelecida entre plantas leguminosas e os organismos fixadores de nitrogênio (rizóbios) e a participação do S no complexo da enzima nitrogenase acentuam a demanda de S pelas leguminosas (TALLEC et al., 2009). Assim, para o adequado funcionamento da leguminosa forrageira nas pastagens, preconiza-se o uso de maiores quantidades de S na adubação em comparação à gramínea forrageira (WERNER; MONTEIRO, 1988; TALLEC et al., 2008).

Monteiro (1986) desenvolveu uma série de experimentos de campo e em casa de vegetação, para testar a fertilização com S em espécie leguminosa. Utilizou um Espodossolo que vinha suportando uma consorciação de trevo branco (*Trifolium repens*) com capim-pensacola pelo período de aproximadamente trinta anos. Na casa de vegetação, o desenvolvimento do trevo branco dependeu da fertilização com S, observando-se incrementos na produção de massa seca, na concentração e na quantidade de S acumulada na planta, à medida em que aumentou a dose de S. No campo, a referida fertilização aumentou anualmente a produção de massa seca e a concentração de S do trevo branco.

Sousa et al. (2001) verificaram resposta positiva à aplicação de gesso (fonte de S) pelo estilosante Mineirão (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão) crescendo num solo argiloso. A produção de massa seca do estilosante Mineirão foi de 13,4 t ha⁻¹ e 19,4 t ha⁻¹ de massa seca, sem aplicação de gesso ou com aplicação de gesso de 3 t ha⁻¹, respectivamente. Tallec et al. (2008) constataram que a aplicação de S aumentou o crescimento de estolões do trevo branco favorecendo a persistência da leguminosa no consórcio com capins. Como o trevo branco possui a capacidade de fixar N atmosférico, o qual é liberado no solo e beneficia outras espécies, o fornecimento de S pode interferir indiretamente na redução da quantidade de fertilizante nitrogenado em sistemas de pastagens.

Referências

- ALVAREZ, V.H.; ROSCOE, R.; KURIHARA, H.; PEREIRA, N.F. Enxofre. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.596-644.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 2000. Lavras. **Anais... Temas em evidências**. Lavras: UFLA, 2000. p.273-309.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T.; RAMOS, A.K.B. *Stylosanthes* as a forage legume at its centre of diversity. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2004. p.37-50.
- BATISTA, K.; MONTEIRO, F.A. Nitrogênio e enxofre nas características morfológicas do capim-Marandu em substituição ao capim-Braquiária em degradação em solo com baixo teor de matéria orgânica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, p.1151-1160, 2008.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v.91, p.179-194, 2003.
- BOHN, H.L.; BARROW, N.J.; RAJAN, S.S.S.; PARFITT, R.L. Reactions of inorganic sulfur in soils. In: TABATABAI, M.A. (Ed.), **Sulfur in Agriculture**, Madison, vol. 27, p. 233-249, 1986. (Agronomy Monograph, ASA, CSSA and ISSA, 1986.)
- BOLTON, J.; NOWAKOWSKI, T.Z.; LAZARUS, W. Sulphur-nitrogen interaction effects on the yield and composition of the protein-N, non-protein-N and soluble carbohydrates in perennial ryegrass. **Journal of Science Food and Agriculture**, Malden, v.27, p.553-560, 1976.
- BROWN, L.; SCHOLEFIELD, D.; JEWKES, E.C.; PREEDY, N.; WADGE, K.; BUTLER, M. The effect of sulphur application on the efficiency of nitrogen use in two contrasting grassland soils. **Journal of Agricultural Science**, New York, v.135, p.131-138, 2000.
- BUCHNER, P.; TAKAHASHI, H.; HAWKESFORD, M.J. Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1765-1773, 2004.
- CARRETO, S.; PARADISO, A.; D'AMICO, L.; DE GARA, L. Ascorbate and glutathione metabolism in two sunflower cell lines of differing α -tocopherol biosynthetic capability. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, p.509-513, 2002.
- CLARKSON, D.T.; DIOGO, E.; AMÂNCIO, S. Uptake and assimilation of sulphate by sulphur deficient *Zea mays* cells: the role of O-acetyl-L-serine in the interaction between nitrogen and sulphur assimilatory pathways. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.37, p.283-290, 1999.

COWLING, D.W.; BRISTOW, A.W. Effects of SO₂ on sulphur and nitrogen fractions on free amino acids in perennial ryegrass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v.30, p.354-360, 1979.

CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. Nitrogen and sulphur. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.786-849.

DE BONA, F.D. **Nitrogênio e enxofre para gramínea forrageira**: atributos do solo e aspectos metabólicos, nutricionais e produtivos da planta. 2009. 124p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

DE KOK, L.J.; KAN, P.J.L.; TÁNCZOS, O.G.; KUIPER, P.J.L. Sulphate induced accumulation of glutathione and frost-tolerance of spinach leaf tissue. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.53, p.435-438, 1981.

DIXON, D.P.; DAVIS, B.G.; EDWARDS, R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. **Journal Biological Chemistry**, Rockville, v.277, p.30859-30869, 2002.

DROUX, M. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. **Photosynthesis Research**, Wageningen, v.79, p.331-348, 2004.

DYNIA, J.F.; CUNHA, N.G. Identificação de deficiências de nutrientes em solos do Pantanal Mato-grossense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, p.1449-1455, 1984.

FAQUIN, V.; LIMA, D.V.; FURTINI NETO, A.E.; MORAES, A.R.; CURTI, N.; HIGA, N.T. Nutrição mineral do braquiário e da soja cultivados em latossolos sob cerrado da região de Cuiabá, MT. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.110-117, 2000.

FAQUIN, V.; CURTI, N.; MARQUES, J.J.G.S.M.; TEIXEIRA, W.G.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, D.; CARVALHO, M.M. Limitações nutricionais para gramíneas forrageiras em cambissolo álico da microrregião Campos da Mantiqueira, MG Brasil. 2. Nutrição em macro e micronutrientes. **Pasturas tropicais**, Cali, v.17, p.17-22, 1995.

FERRARI NETO, J. **Limitações nutricionais para o colômbio (*Panicum maximum* Jacq.) e braquiária (*Brachiaria decumbes* Stap) em latossolo da região noroeste do Paraná**. 1991. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. The molecular biology and metabolism of glutathione . In: GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L. J. (Ed.). **Significance of glutathione in plant adaption to the environment**. Dordrecht:Kluwer Academic Publishers, 2001. p.27-56.

GIORDANO, M.; PEZZONI, V.; HELL, R. Strategies for the allocation of the resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.857-864, 2000.

GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L.J. **Significance of glutathione in plant adaptation to the environment**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 263p.

HAWKESFORD, M.J. Plant response to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.131-138, 2000.

HAWKESFORD, M.J.; DE KOK, L.J. Managing sulphur metabolism in plants. **Plant Cell and Environment**, Malden, v.29, p.382-395, 2006.

HAWKESFORD, M.J.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MOLLER, I. S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.) **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2012. p.135-189.

HELL, R. Molecular physiology of plant sulfur metabolism. **Planta**, New York, v.202, p.138-148, 1997.

HELL, R.; RENNENBERG, H. The plant sulphur cycle. In: SCHNUG, E. (Ed.). **Sulphur in agroecosystems**. Dordrecht; Boston, London: Kluwer academic publishers, 1998. p.135-173.

HELL, R.; HILLEBRAND, H. Plant concepts for mineral acquisition and allocation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.12, p.161-168, 2001.

HERSCHBACH, C.; RENNENBERG, H. Influence of glutathione (GSH) on sulphate influx, xylem loading and exudation in excised tobacco roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, p.1021-1029, 1991.

_____. Influence of glutathione on net uptake of sulphate transport in tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.1069-1076, 1994.

_____. Long-distance transport of ³⁵S-sulphur in 3-year-old beech trees (*Fagus sylvatica*). **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 95, p.379-386, 1995.

_____. Sulfur nutrition in deciduous trees. **Naturwissenschaften**, New York, v.88, p.25-36, 2001.

JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., 1995. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p.21-58.

JANK, L.; MARTUSCELLO, J.A.; EUCLIDES, V.P.B.; VALLE, C.B.; RESENDE, R.M.S. *Panicum maximum*. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.). **Plantas forrageiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. p.166-196.

- KALMBACHER, R.S.; EZENWA, I.V.; ARTHINGTON, J.D.; MARTIN, F.G. Sulfur fertilization of Bahiagrass with varying levels of nitrogen fertilization on a Florida Spodosol. **Agronomy Journal**, Madison, v.97, p.661-667, 2005.
- KARMOKER, J.L.; CLARKSON, D.T.; SAKER, L.R.; ROONEY, J.M.; PURVES, J.V. Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. **Planta**, New York, v.185, p.269-278, 1991.
- KOCSY, G.; BRUNNER, M.; RÜEGSEGG, A.; STAMP, P.; BRUNOLD, C. Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. **Planta**, New York, v.198, p.365-370, 1996.
- KOPRIVA, S.; RENNENBERG, H. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1831-1842, 2004.
- KOWALENKO, C.G. Variations in within-season nitrogen and sulfur interaction effects on forage grass response to combinations of nitrogen, sulfur, and boron applications. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v.35, p.759-780, 2004.
- LAM, L.; K.T.; SPARNINS, V.L.; WATTENBERG, L.W. Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferase activity in the mouse. **Cancer Research**, Philadelphia, v.42, p.1193-1198, 1982.
- LAMOUREX, G.L.; RUSNESS, D.G. The role of glutathione and glutathione S-transferases in pesticide metabolism, selectivity and mode of action in plants and insects. In: DOLPHIN, D.; POULSON, R.; AVRAMOVIC, O. (Ed.). **Glutathione: chemicals biochemical and medical aspects**, v. IIIB, Ser: Enzyme and Cofactors. New York: Wiley, 1989. p.153-196.
- LAPPARTIENT, A.G.; VIDMAR, J.J.; LEUSTEK, T.; GLASS, A.D.; TOURAINE, B. Inter organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. **Plant Journal**, Malden, v.18, p.89-95, 1999.
- LARSSON, C.M.; LARSSON, M.; PURVES, J.V.; CLARKSON, D.T. Translocation and cycling through roots of recently absorbed nitrogen and sulfur in wheat (*Triticum aestivum*) during vegetative and generative growth. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.82, p.345-352, 1991.
- LAVRES JR., J.; MONTEIRO, F.A.; SCHIAVUZZO, P.F. Concentração de enxofre, valor SPAD e produção do capim-Marandu em resposta ao enxofre. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.3, p.225-231, 2008.
- LEWIS, G.P.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 578p.

LIMA, D.V.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; MORAIS, A.R.; CURI, N.; HIGA, N.T. Macro e micronutrientes no crescimento do braquiarião e da soja em latossolos sob cerrado da região de Cuiabá, MT. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.96-104, 2000.

MACHADO, A.O.; CECATO, U.; MIRA, R.T.; PEREIRA, L.A.F.; DAMASCENO, J.C. Avaliação da composição química e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de cultivares e acessos de *Panicum maximum* Jacq. sob duas alturas de corte. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v.27, p.1057-1063, 1998.

MARUYAMA-NAKASHITA, A.; NAKAMURA, Y.; YAMAYA, T.; TAKAHASHI, H. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1843-1849, 2004.

MATHOT, M.; MERTENS, J.; VERLINDEN, G.; LAMBERT, R. Positive effects of sulphur fertilisation on grasslands yields and quality in Belgium. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v.28, p.655-658, 2008.

MIGGE, A.; BORK, C.; HELL, R.; BECKER, T.W. Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine or asparagines accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. **Planta**, New York, v.211, p.587-595, 2000.

MILLARD, P.; SAHARP, G.S.; SCOTT, N.M. The effect of sulphur deficiency on the uptake and incorporation of nitrogen in ryegrass. **Journal of Agricultural Science**, New York, v.105, p.501-504, 1985.

MONTEIRO, F.A. **Sulfur fertilization and nutrient distribution in a Florida spodosol profile under white clover – Pensacola bahiagrass**. Gainesville: University of Florida, 1986. 182p. (Ph.D. Dissertation), University of Florida, Florida, 1986.

MONTEIRO, F.A.; CARRIEL, J.M. Aplicação de níveis de enxofre na forma de gesso para cultivo do capim Colonião em dois solos arenosos do Estado de São Paulo. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.44, p.335-347, 1987.

MORIKAWA, C.K.; FAQUIN, V.; CURI, N.; MAEQUES, E.S.; WERNEK JUNIOR, M.R.; EVANGELISTA, A.R. Crescimento e produção de gramíneas forrageiras em amostras de latossolo da região dos Campos das Vertentes, MG, Brasil. **Pastures Tropicales**, Cali, v.20, p.18-23, 1998.

NIKIFOROVA, V.J.; BIELECKA, M.; GAKIÈRE, B.; KRUEGER, S.; RINDER, J.; KEMPA, S.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.-R.; HESSE, H.; HOEFGEN, R. Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. **Amino Acids**, New York, v.30, p.173-183, 2006.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1283-1304, 2002.

NOCTOR, G.; ARISI, A.M.; JOUANIN, L.; KUNERT, K.J.; RENNENBERG, H.; FOYER, C.H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.623-647, 1998.

OTERO, J.R. **Informações sobre algumas plantas forrageiras**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, 1952. 313 p. (Serviço de Informação Agrícola. Serie Didática, 11).

PROSSER, I.A.; PURVES, J.V.; SAKER, L.R.; CLARKSON, D.T. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.113-121, 2001.

REGO, F.C.A. **Avaliação da qualidade, densidade e características morfológicas do capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq cv. Tanzânia-1) manejado em diferentes alturas, sob pastejo**. 2001. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

RENNENBERG, H. The fate of excess sulfur in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p.121-153, 1984.

_____. Glutathione – An ancient metabolite with modern tasks. In: GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L.J. (Ed.). **Significance of glutathione in plant adaptation to the environment**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.1-11.

_____. Processes involved in glutathione metabolism. In: WALLSGROVE, R.M.(Ed.) **Amino acids and their derivatives in higher plants- biosynthesis and metabolism**. Cambridge University Press, Cambridge, 1995. p. 155-171.

RENNENBERG, H.; SCHMITZ, K.; BERGMAN, L. Long distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. **Planta**, New York, v.176, p.68-74, 1979.

ROUACHED, H.; WIRTZ, M.; ALARY, R.; HELL, R.; ARPAT, A.B.; DAVIDIAN, J.; FOURCROY, P.; BERTHOMIEU, P. Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v.147, p.897-911, 2008.

ROUHIER, N.; LEMAIRE, S.D.; JACQUOT, J.-P. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.59, p.143-166, 2008.

SANTOS, A.R. **Diagnose nutricional e respostas do capim Braquiária submetido a doses de nitrogênio e enxofre**. 1997. 115p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz,” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

SCHERER, H.W. Sulfur in crop production- invited paper. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v.14, p.81-111, 2001.

SCHMIDT, F.; DE BONA, F.D.; SILVEIRA, C.P.; MONTEIRO, F.A. Soil sulfur fractions dynamics and distribution in a tropical grass pasture amended with nitrogen and sulfur fertilizers. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v.175, p.60-67, 2012.

SMITH, I.K.; KENDALL, A.C.; KEYS, A.J.; TURNER, J.C.; LEA, P.J. The regulation of the biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) **Plant Science**, Clare, v.41, p.11-17, 1985.

SOUSA, D.M.G.; VILELA, L.; LOBATO, E.; SOARES, W.V. **Uso de gesso, calcário e adubos para pastagens no cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 22p.

STACE, H.M.; EDYE, L.A. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. 636p.

SUNARPI, A.; ANDERSON, J.W. Effect of nitrogen nutrition on the export of sulphur from leaves in soybean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.188, p.177-187, 1997.

TALLEC, T.; DIQUELÓU, S.; FAUVEAU, C.; BATAILLÉ, M.P.; OURRY, A. Effects of nitrogen and sulfur gradients on plant competition, N and S use efficiencies and species abundance in a grassland plant mixture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.313, p.267-282, 2008.

TALLEC, T.; DIQUELÓU, S.; AVICE, J.C.; LESUFFLEUR, F.; LEMAUVIEL-LAVENANT, S.; CLIQUET, J.B.; OURRY, A. Availability of N and S affect nutrient acquisition efficiencies differently by *Trifolium repens* and *Lolium perenne* when grown in monoculture or in mixture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.66, p.309-316, 2009.

TARAWALI, G.; DEMBELÉ, E.; N'GUESSAN, B.; YOURI A. Smallholders' Use of *Stylosanthes* for sustainable food production in Subhumid West Africa. In: **International workshop on green-manure cover crop systems for smallholders in tropical and subtropical regions**. Chapeco: Doc. 18. Homepage: http://www.crdi.ca/es/ev-31918-201-1do_topic.html>. 1997, [Online].

THOMAS, S.G.; BILSBORROW, P.E.; HOCKING, T.J.; BENNETT, J. Effect of sulphur deficiency on the grown and metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* cv Druid). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v.80, p.2057-2062, 2000.

WERNER, J.C. **Adubação de pastagens**. Instituto de Zootecnia: Nova Odessa, 1984. 49p. (Boletim técnico, 18).

WERNER, J.C.; MONTEIRO, F.A. Respostas das pastagens a aplicação de enxofre. In: **ENXOFRE E MICRONUTRIENTES NA AGRICULTURA BRASILEIRA**. 1988. Londrina, **Anais...** Londrina: Embrapa, CNPS; IAPAR: Londrina, 1988. p.87-102.

WONISCH, W.; SCHAUR, R.J. Chemistry of glutathione. In: GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L. J. (Ed.). **Significance of glutathione in plant adaptation to the environment**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.13-26.

3 APLICAÇÃO DE ENXOFRE ALTERA MORFOLOGIA, CRESCIMENTO E ESTADO NUTRICIONAL DO CAPIM-TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO

Resumo

As plantas forrageiras constituem a mais importante fonte de alimento para os ruminantes e o crescimento da parte aérea e do sistema radicular dessas plantas dependem do suprimento de nutrientes minerais. Objetivou-se identificar e quantificar as modificações morfológicas, produtivas e nutricionais do *Panicum maximum* cv. Tanzânia e do *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão, em função da disponibilidade de S. As doses de S aplicadas para cada espécie foram ajustadas de modo a permitir nutrição baixa, intermediária e alta de S. As doses de S fornecidas foram 0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L⁻¹ para o capim e 0,10; 0,70; 1,30; 1,90 e 2,50 mmol L⁻¹ para o estilosante. O S influi diretamente na emissão de folhas e de perfilhos, área foliar, comprimento e superfície radicular do capim-tanzânia e do estilosante aumentando a produção de massa seca da parte aérea e as raízes. A limitação de S altera a distribuição de fotossintatos entre a parte aérea e raízes das plantas de capim-tanzânia e estilosante, proporcionando redução na produção de massa seca das raízes. As plantas de capim-tanzânia aumentam a superfície radicular como mecanismo de adaptação à limitação de S no meio de cultivo. O índice relativo de clorofila (IRC) das folhas recém-expandidas se relaciona com a produção de massa seca da parte aérea, podendo ser utilizado para avaliar o estado nutricional em S no capim-tanzânia e no estilosante. A aplicação de S mostra-se necessária para aumentar a produção de massa seca do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão.

Palavras-chave: Área foliar; Concentração de enxofre; Nutrição de enxofre; Produção de forragem; Razão raízes/parte aérea; Sistema radicular

Abstract

Forage crops are the most important source of food for ruminants and growth of aboveground and roots of these plants depend on the supply of mineral nutrients. The objective was to identify and quantify morphological, productive and nutritional changes in *Panicum maximum* cv. Tanzania and *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão, depending on the availability of S. The applied rates of S for each species were adjusted to low, intermediate and high S nutrition. The S rates given were 0.10, 0.55, 1.00, 1.45 and 1.90 mmol L⁻¹ for Guinea grass and 0.10, 0.70, 1.30, 1.90 and 2.50 mmol L⁻¹ for stylo. Sulfur supply influences the emission of leaves, tillering, leaf area, root length and surface of Guinea grass and stylo increasing production of dry mass of aboveground and roots. Sulfur limitation alters the distribution of photosynthates between aboveground and roots of Guinea grass and stylo providing reduction in dry matter production of roots. The plants of Guinea grass increase root surface as a mechanism for adaptation to limited S in the culture medium. The relative chlorophyll index (RCI) in the recently expanded leaves relates to the production of dry mass of aboveground and can be used to assess S nutritional status in Guinea grass and stylo. The application of S proves necessary to increase production of dry mass in Guinea grass and stylo.

Keywords: Forage production; Leaf area; Root/shoot ratio; Root system; Sulfur concentration; Sulfur nutrition

3.1 Introdução

O enxofre (S) é um dos elementos essenciais requeridos pelas plantas e as exigências nutricionais nesse nutriente variam com a espécie e a taxa de crescimento das plantas. Mecanismos de adaptação, desde a regulação de absorção e assimilação até a modificação da forma de crescimento, ocorrem nas plantas de modo a otimizar a oferta e a demanda de S dentro da planta (HAWKESFORD; DE KOK, 2006). As respostas morfológicas típicas das plantas em solos cuja disponibilidade de nutrientes é limitada incluem maior desenvolvimento das raízes, incremento na razão raízes/parte aérea, raízes mais finas e pêlos radiculares mais longos, todos contribuindo para aumentar a superfície total de absorção do sistema radicular, facilitando a exploração de maior volume de solo. Assim, as alterações na morfologia e fisiologia das raízes das plantas podem afetar a aquisição de S e demais nutrientes (LÓPEZ-BUCIO; CRUZ-RAMIREZ; HERRERA-ESTRELLA, 2003). Na parte aérea, a deficiência de S pode resultar em menores expansão foliar, taxa fotossintética e condutância estomática (JUSZCZUK; OSTASZEWSKA, 2011; WULFF-ZOTTELE et al., 2010), com consequência no menor crescimento da planta.

Considerando o estado nutricional das plantas forrageiras, pesquisas anteriores demonstraram a importância do fornecimento do S para o incremento da produção de forragem em espécies de gramíneas e leguminosas forrageiras (RECHCIGL, 1991; WANG et al., 2003; TALLEC et al., 2008; LAVRES JR.; MONTEIRO; SCHIAVUZZO, 2008). Tallec et al. (2008) observaram o efeito positivo da aplicação de S no número de folhas emitidas por planta e na área foliar do *Lolium perenne* (azevém). Lavres Jr., Monteiro e Schiavuzzo (2008) observaram aumento no número de perfilhos, na produção de massa seca da parte aérea e das raízes, nos índices relativos de clorofila (unidades SPAD) e nas concentrações de S na parte aérea e raízes da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (capim-Marandu). Em programas de adubação, a não inclusão de S tem proporcionado concentrações muito baixas desse nutriente em várias gramíneas e leguminosas forrageiras, conforme os trabalhos relatados por Santos e Monteiro (1999), Wang et al. (2001) e Kowalenko (2004), os quais demonstraram claramente que a falta de adubação com S resultou em concentrações desse nutriente abaixo das consideradas ideais para as gramíneas e leguminosas forrageiras.

A compreensão das alterações nas características morfológicas que afetam a produção de forragem e a aquisição de S nas plantas de *Panicum maximum* cv. Tanzânia (capim-tanzânia) e do *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (estilosante Mineirão) sob variadas disponibilidades de S é importante para facilitar a implantação e manutenção destas espécies

nas condições de campo e o desenvolvimento destas plantas como pasto de modo a melhorar a produtividade e a sustentabilidade das pastagens. Considerando que a disponibilidade de S interfere no crescimento da parte aérea e do sistema radicular, comprometendo a produtividade das plantas, objetivou-se identificar e quantificar as modificações fisiológicas, produtivas e nutricionais ocorridas no capim-tanzânia e no estilante Mineirão em função das disponibilidades de S.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Condições de crescimento, disponibilidades de S e delineamento experimental

Dois experimentos foram conduzidos durante o verão em casa de vegetação (temperatura média de 30°C e fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas de escuro), cultivando a gramínea forrageira *Panicum maximum* cv. Tanzânia (capim-tanzânia) e a leguminosa forrageira estilante Mineirão (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão). As sementes de ambas as espécies foram germinadas em bandejas contendo areia lavada e fornecimento diário de água desionizada. As plântulas foram transplantadas 15 dias após a semeadura, para vasos plásticos (20 cm de altura, 15,5 cm de diâmetro e capacidade de 3,6 L) contendo substrato inerte (quartzo moído, com diâmetro entre 2 e 8 mm). Cinco plantas de cada espécie foram crescidas separadamente em cada vaso. Os experimentos foram estabelecidos em blocos casualizados, com quatro repetições.

As doses de S foram diferenciadas para as duas espécies, em virtude dos requerimentos nutricionais referentes ao S serem mais elevados pelas leguminosas. O S foi suprido na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) para simular condições de nutrição baixa, intermediária e alta de S para as plantas. Cinco doses de S na solução nutritiva foram testadas para o capim-tanzânia (0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L⁻¹) e para o estilante (0,10; 0,70; 1,30; 1,90 e 2,50 mmol L⁻¹). A composição da solução nutritiva para os demais nutrientes continha 1 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄, 5 mmol L⁻¹ de KCl, 2 mmol L⁻¹ de KNO₃, 5 mmol L⁻¹ de Ca(NO₃)₂, 9 mmol L⁻¹ de NH₄NO₃, 46 µmol L⁻¹ de H₃BO₃, 9 µmol L⁻¹ de MnCl₂, 0,73 µmol L⁻¹ de ZnCl₂, 0,30 µmol L⁻¹ de CuCl₂, 0,11 µmol L⁻¹ de H₂MoO₄ [H₂O] e 100 µmol L⁻¹ de Fe(III)-EDTA. O S na solução nutritiva foi fornecido pelo uso do sal MgSO₄. A concentração de magnésio (Mg²⁺) foi ajustada em todas as doses de S, utilizando-se uma solução com MgCl₂ de modo que a concentração final desse nutriente foi igual a 2 mmol L⁻¹.

As plântulas foram crescidas até o quinto dia após o transplante em solução nutritiva diluída, com concentração correspondente a um quarto da completa. Após esse período

efetuiu-se a substituição pela solução nutritiva definitiva, a qual foi renovada a cada 14 dias para ambas as espécies.

3.2.2 Colheita das plantas e avaliações dos parâmetros morfológicos, produtivos e nutricionais das plantas

Duas colheitas das plantas (dois ciclos de crescimento) foram realizadas para cada espécie durante o período experimental. A parte aérea do capim foi colhida aos 35 dias após o transplante (corte 5 cm acima da junção parte aérea-raízes) e aos 30 dias após a primeira colheita (corte rente à junção parte aérea-raízes). Os dois cortes do capim foram realizados quando as folhas maduras das plantas nos vasos que estavam em estado fisiológico mais avançado iniciaram a processo de senescência. A parte aérea do capim-tanzânia foi separada em folhas e colmos. A parte aérea do estilosante foi colhida aos 50 dias após o transplante (corte 20 cm acima da junção parte aérea- raízes) e aos 27 dias após a primeira colheita (corte rente a junção parte aérea- raízes). Os dois cortes do estilosante foram realizados quando as plantas mais altas atingiram 60 cm de altura.

O número total de perfilhos do capim-tanzânia, o número total de folhas e a área foliar do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão foram quantificados na ocasião das duas colheitas. A área foliar foi determinada com o uso do aparelho integrador de área foliar LICOR®, modelo LI 3100. O índice relativo de clorofila (IRC), em valor SPAD, foi estimado de forma indireta na ocasião das duas colheitas pelo *Chlorophyll Meter SPAD-502*, (*Soil-Plant Analysis Development Section, Minolta Camera Co., Osaka, Japan*). As leituras com o clorofilômetro foram realizadas no terço médio das lâminas (capim) e no folíolo central (estilosante) de duas folhas recém-expandidas. Foi computada a média de dez leituras executadas nas plantas de cada vaso.

As raízes foram coletadas somente após a segunda colheita das plantas. As raízes foram separadas do substrato e lavadas com água corrente e água desionizada, utilizando-se peneiras de malhas de 0,25 e 1,00 mm. Foi retirada uma subamostra do sistema radicular correspondente a cerca de 20% da massa fresca total, de acordo com Rossiello et al. (1995). Essas subamostras foram colocadas em solução de violeta genciana a 50 mg L⁻¹ durante 24 horas, para que todas as raízes ficassem tingidas. As raízes foram colocadas sobre folhas de acetato, evitando-se sobreposição, e foram digitalizadas com *scanner* HP® Scanjet 3670 (300 dpi, Hewlett-Packard Development Company, Houston, Texas, EUA) para obtenção das imagens, que foram submetidas ao aplicativo SIARCS (Sistema Integrado para Análise de

Raízes e Cobertura do Solo) versão 3.0, para determinar o comprimento e a superfície total das raízes de cada vaso.

Todo material vegetal colhido foi colocado para secar em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante, com posterior pesagem em balança de precisão para a obtenção dos resultados de produção de massa seca da parte aérea e das raízes das plantas. Depois da pesagem, foi realizada a moagem de cada componente da planta em moinho do tipo Wiley, para determinação da concentração de S nos tecidos vegetais coletados.

A concentração de S na parte aérea e nas raízes das plantas foi determinada conforme metodologia descrita por Tabatabai (1982). O extrato para determinação do S foi obtido via digestão nítrico-perclórica, a partir do qual foi determinado o S pelo método analítico da turbidimetria do cloreto de bário. O acúmulo desse nutriente foi calculado multiplicando-se a massa seca pela concentração do elemento no respectivo componente da planta.

3.2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SAS versão 9.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004) e a análise de variância foi realizada para cada espécie forrageira. Quando houve significância do teste F para as doses de S, realizou-se o estudo de regressões de primeiro e de segundo grau e exponenciais, utilizando o comando GLM (General Linear Model). Os símbolos (*) e (**) nas equações de regressão indicam o nível de significância ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$), respectivamente.

3.3 Resultados

3.3.1 Morfologia e crescimento da parte aérea

O aumento no fornecimento de S, tanto para o capim-tanzânia quanto para o estilosante, afetou significativamente o crescimento da parte aérea, promovendo alterações no número total de folhas emitidas e na expansão da área foliar nos dois crescimentos (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D). Os números máximos de folhas do capim-tanzânia foram obtidos com o fornecimento de S de 1,21 mmol L⁻¹ no primeiro corte e 1,39 mmol L⁻¹ no segundo corte e foram 51% e 72% superiores aos das plantas crescidas com S de 0,10 mmol L⁻¹, para os respectivos cortes. Para o estilosante, no primeiro corte o número máximo de folhas foi obtido com o suprimento de S de 2,12 mmol L⁻¹. No segundo corte, o número de folhas do estilosante foi quase duas vezes superior ao do primeiro corte e atingiu valor máximo e constante com o fornecimento de S de 0,70 mmol L⁻¹.

Figura 1 - Número folhas (A, B), área foliar (C, D) e relação entre a área foliar e a produção de massa seca das folhas (E, F) no capim-tanzânia e estilosate Mineirão no primeiro e segundo corte das plantas em resposta a aplicação de doses de S

As plantas de capim-tanzânia e de estilosate, na ocasião do primeiro corte, apresentaram aumento linear da área foliar, de acordo com a disponibilidade de S (Figuras 1C e 1D). Entretanto, no segundo corte a área foliar máxima do capim foi atingida quando se aplicou S de 1,42 mmol L⁻¹, enquanto que a área foliar no estilosate atingiu valor máximo e constante com o suprimento de S de aproximadamente 0,70 mmol L⁻¹. A área foliar do capim-tanzânia e do estilosate apresentaram relação significativa e positiva com a produção de massa seca das folhas nos dois crescimentos (Figuras 1E e 1F). Assim, o fornecimento de S

favoreceu o aumento da área foliar dessas plantas, o que se refletiu em maior produção de massa seca das folhas.

O número de perfilhos do capim-tanzânia aumentou expressivamente com o acréscimo na disponibilidade de S (Figuras 2A). A máxima emissão de perfilhos foi alcançada com a disponibilidade de S de 1,19 mmol L⁻¹ (32 unidades) e 1,31 mmol L⁻¹ (37 unidades) na ocasião do primeiro e do segundo corte, respectivamente. A disponibilidade limitante de S, além de proporcionar reduzido número de perfilhos, também alterou a distribuição da massa seca na parte aérea do capim-tanzânia. No segundo corte, as plantas crescidas em condições nutricionais subótimas de S apresentaram maior proporção de massa seca nos colmos em relação a das folhas (Figura 2B).

Figura 2- Número de perfilhos (A) e razão colmos/folhas (B) do capim-tanzânia na época do primeiro e do segundo corte das plantas, em resposta à aplicação de doses de S.

Os números de perfilhos e de folhas e a área foliar do capim-tanzânia se correlacionaram positivamente com a produção de massa seca da parte aérea, das raízes e do total das plantas (Tabela 1).

Tabela 1 - Coeficiente de correlação entre a produção de massa seca (MS) e parâmetros morfológicos da parte aérea e das raízes na época do segundo corte do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão ($n=40$)

Variáveis	Capim-tanzânia				
	Nº perfilhos	Nº folhas	Área foliar	Comp. raízes	Sup. raízes
MS parte aérea	0,88**	0,91**	0,95**	0,92**	-0,85**
MS raízes	0,76**	0,79**	0,81**	0,90**	-0,63**
MS total	0,88**	0,90**	0,94**	0,95**	-0,84**
Variáveis	Estilosante Mineirão				
	Nº folhas	Área foliar	Comp. raízes	Sup. raízes	
MS parte aérea	0,92**	0,94**	0,72**	0,76**	
MS raízes	0,72**	0,63**	0,87**	0,84**	
MS total	0,88**	0,87**	0,68**	0,63*	

* e ** são significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente

O número de folhas e a área foliar do estilosante também correlacionaram-se positivamente com a produção de massa seca da parte aérea, das raízes e do total das plantas (Tabela 1). Dentre as variáveis correlacionadas, a área foliar foi a que apresentou maior coeficiente de correlação com a produção de massa seca na parte aérea do capim-tanzânia (95%) e do estilosante (94%) na ocasião do segundo corte.

As plantas de capim-tanzânia e de estilosante crescidas com o fornecimento de S 0,10 mmol L⁻¹ apresentaram sintoma visual de deficiência de S, com a clorose das folhas novas. As plantas de capim-tanzânia com sintoma visual de deficiência de S apresentaram valores de IRC próximos a 20 unidades SPAD nas folhas recém-expandidas durante os dois períodos de crescimento (Figura 3A). No estilosante, os valores de IRC nas folhas recém-expandidas das plantas com sintoma visual de deficiência de S foram 19 unidades SPAD no primeiro crescimento e 27 unidades SPAD no segundo crescimento (Figura 3B).

Figura 3 - Índice relativo de clorofila - IRC (A, B) e relação entre o IRC e a produção de massa seca da parte aérea (C, D) do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão, no primeiro e segundo corte das plantas

Os valores de IRC nas folhas recém-expandidas do capim-tanzânia e do estilosante apresentaram relação significativa e positiva com a produção de massa seca na parte aérea nos dois cortes das plantas. No capim, os valores de IRC próximos a 40 unidades SPAD foram relacionados à máxima produção de massa seca nos dois cortes (Figura 3C). No estilosante, os valores de IRC de 33 e 39 unidades SPAD foram relacionados à máxima produção de massa seca no primeiro e segundo corte, respectivamente (Figura 3D).

3.3.2 Morfologia e crescimento do sistema radicular

Para ambas as espécies, o incremento no fornecimento de S resultou em aumento significativo no comprimento das raízes (Figuras 4A e 4B). No entanto, a resposta da superfície radicular destas espécies à aplicação de S foi diferenciada. Enquanto no capim-tanzânia a maior superfície radicular ocorreu nas plantas crescidas sob limitação de S ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), para o estilosante a superfície radicular respondeu positivamente à aplicação de S (Figuras 4B e 4C). Assim, a superfície radicular foi aumentada com o incremento na disponibilidade de S até dose de $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$, seguida de decréscimo de 32% com o fornecimento de S de $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$. A disponibilidade alta de S no meio de cultivo e possíveis reservas do nutriente armazenadas no tecido vegetal do estilosante podem ter induzido a planta a poupar energia despendida para a expansão do sistema radicular nesta condição.

A superfície radicular do capim-tanzânia foi quatro vezes maior nas plantas crescidas em menor suprimento de S do que nas condições de maior suprimento desse nutriente. As modificações observadas na morfologia das raízes do capim-tanzânia mostraram que a limitação da disponibilidade de S estimulou a formação de novas raízes primárias e/ou secundárias laterais e mais finas, aumentando assim a superfície total de absorção do sistema radicular, de modo a explorar maior volume de substrato.

No capim-tanzânia, a produção de massa seca das raízes, da parte aérea e do total das plantas correlacionou-se positivamente com o comprimento radicular e negativamente com a superfície radicular (Tabela 1). Para o estilosante, tanto o comprimento quanto a superfície radicular foram positivamente correlacionados com a produção de massa seca das raízes, da parte aérea e do total das plantas (Tabela 1).

Figura 4 - Comprimento (A, B) e superfície (C, D) radicular do capim-tanzânia e do estiloso Mineirão, no segundo corte das plantas, em resposta à aplicação de doses de S

3.3.3 Influência da nutrição de enxofre na produção e alocação de biomassa

O aumento na disponibilidade de S interferiu significativamente tanto na produção de massa seca da parte aérea quanto das raízes do capim-tanzânia e do estiloso Mineirão (Figura 5). Além disso, a produção total de massa seca na parte aérea (somatório dos dois crescimentos) do capim-tanzânia e do estiloso apresentaram relação significativa e positiva com a produção de massa seca das raízes (Figura 6).

O crescimento das plantas de ambas as espécies em disponibilidade baixa de S foi significativamente reduzido, alterando a razão das produções de massa seca das raízes/parte aérea (Figuras 5E e 5F). Nas plantas carentes em S, a razão das produções de massa seca de raízes/parte aérea foi mais elevada em relação às plantas crescidas em maiores disponibilidades de S. Portanto, a produção de massa seca da parte aérea foi mais afetada do que as raízes para ambas as espécies, em condição de carência de S.

Figura 5 - Massa seca da parte aérea (A, B) no primeiro e segundo corte e massa seca radicular (C, D) e razão raízes/parte aérea (E, F) do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão, no segundo corte das plantas, em resposta à aplicação de doses de S

A disponibilidade de S interferiu na partição da produção de massa seca entre a parte aérea e as raízes das plantas. As plantas de ambas as espécies crescidas em S de 0,10 mmol L⁻¹ aumentaram a participação da massa seca das raízes no total da produção (Figuras 6C e 6D), comparativamente às plantas cultivadas nas demais doses testadas. As plantas de capim crescidas sob limitação de S apresentaram 51% da massa seca total distribuída nas raízes, enquanto nas demais doses a contribuição da massa seca das raízes esteve entre 25 e 31% da massa seca total das plantas. No estilosante crescido sob limitação

de S cerca de 23% da massa seca total foi alocado nas raízes, mas de 11 a 14% da massa seca total corresponderam a raízes nas demais doses.

Figura 6 - Relação entre as produções de massa seca (MS) das raízes e da parte aérea (A, B) e distribuição da produção de massa seca na planta (C, D) do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão, em resposta à aplicação de doses de S

3.3.4 Concentração e acúmulo de enxofre na parte aérea e raízes

A concentração e o acúmulo de S na parte aérea e raízes do capim-tanzânia e do estilosante responderam linear e positivamente ao suprimento de S na solução nutritiva (Figura 7). As máximas concentrações de S na parte aérea do capim foram 1,0 g kg⁻¹ (primeiro corte) e 1,5 g kg⁻¹ (segundo corte) e 1,2 g kg⁻¹ nas raízes das plantas crescidas na dose de S de 1,90 mmol L⁻¹. Para o estilosante as máximas concentrações de S na parte aérea foram 3,6 g kg⁻¹ (primeiro corte) e 3,3 g kg⁻¹ (segundo corte) e nas raízes (5,7 g kg⁻¹) foram observadas com o suprimento de 2,50 mmol L⁻¹ de S.

Figura 7 - Concentração e acúmulo de enxofre na parte aérea e raízes do capim-tanzânia (A, B) e do estilosante Mineirão (C, D) em resposta a aplicação de doses de S

3.4 Discussões

Estudos prévios mostraram que aumentando o fornecimento de S ocorrem acréscimos na produção de massa seca da parte aérea de plantas forrageiras (SINCLAIR et al., 1996; MURPHY et al., 2002; TALLEC et al., 2008; LAVRES JR; MONTEIRO; SCHIAVUZZO, 2008). No entanto, as interações entre a parte aérea e as raízes na regulação da assimilação de S versus captação e distribuição de fotoassimilados ainda são pouco compreendidos nas plantas forrageiras. Neste estudo foi observado que em ambas as espécies forrageiras, os produtos fotossintéticos foram mais alocados na parte aérea do que nas raízes, com o aumento no fornecimento de S (Figuras 5C e 5D). Embora o incremento no fornecimento de S tenha aumentado também a produção de massa seca das raízes, esse nutriente promoveu o decréscimo da razão entre as produções de massa seca das raízes e da parte aérea (Figuras 4G

e 4H), indicando que o fornecimento de S aumenta mais o crescimento da parte aérea do que o das raízes.

Entretanto, nas plantas de capim-tanzânia crescidas em disponibilidade limitada de S, a maior parte dos fotossintatos produzidos foi alocado para as raízes em relação à parte aérea. Resultados similares foram mostrados em condições de limitação de S para plantas de alfafa (*Medicago sativa*) (WANG et al., 2003) e feijão (*Phaseolus vulgaris* cv. Zlota saxa) (JUSZCZUK; OSTASZEWSKA, 2011). Wang et al. (2003) mostraram que plantas de alfafa crescidas sem o fornecimento de S apresentaram razão raízes/parte aérea de 0,88 enquanto que, com a aplicação de S, o valor da razão foi 0,47. Juszczuk e Ostaszewska (2011) mostraram que a deficiência de S para o feijão resultou em menores crescimento, produção de massa seca da parte aérea e razão parte aérea/raízes. Além disso, o conteúdo de ATP decresceu muito mais severamente nas folhas (-48%) do que nas raízes (-20%) das plantas deficientes, o que indica decréscimo da fotossíntese. Assim, a mais baixa disponibilidade de energia nas folhas de plantas de feijão deficientes em S restringiu o crescimento da parte aérea em comparação com as raízes, onde a concentração de ATP provavelmente atendeu a demanda de energia para o crescimento semelhante a das plantas de feijão supridas com S.

A aplicação do S, tanto para a gramínea quanto para a leguminosa forrageira, foi responsável pelo aumento na produção de forragem principalmente pelo efeito na área foliar e no número de folhas emitidas (Figura 1). Na gramínea forrageira, a adição de S além de aumentar a produção de massa seca das folhas também diminuiu a proporção colmo/folhas (Figura 2B). Assim, a adição de S em solos com baixa disponibilidade de S pode resultar em maior produção e consumo de pasto para alimentar os ruminantes, uma vez que a produção de forragem e a estrutura do dossel (como proporção haste/folha, massa seca das folhas e área foliar) podem influenciar a ingestão e a dieta da forragem (POPPI; MINSON; TERNOUTH, 1980; COLEMAN, 1992).

O S atua juntamente com o N na síntese de proteínas nas plantas (CRAWFORD et al., 2002) e o metabolismo das espécies forrageiras é afetado pela disponibilidade de S no solo (DE BONA, 2008). Portanto, a aplicação de S para capim-tanzânia e estilosante provavelmente aumentou a síntese de proteínas e, como resultado, incrementou o crescimento e a produção de folhas (Figura 1). Com o crescimento acelerado das folhas, tanto a área foliar quanto a capacidade fotossintética das plantas são aumentadas, favorecendo ainda mais o processo de desenvolvimento de novas folhas (PARSONS et al., 1983; AKMAL; JANSSENS, 2004).

Além do desenvolvimento e crescimento foliar, nas gramíneas forrageiras o perfilhamento também é um dos fatores determinantes na produção de massa seca da forragem (MCKENZIE; JACOBS; KEARNEY, 2002; PREMAZZI; MONTEIRO; CORRENTE, 2003) e alterações ocorrem de acordo com a fertilidade do solo. O perfilhamento do capim-tanzânia foi duas vezes maior com a disponibilidade adequada de S (Figura 2A), em relação à baixa disponibilidade. O número de perfilhos é frequentemente utilizado como indicador de vigor ou persistência das gramíneas na pastagem. Portanto, a resposta no perfilhamento do capim-tanzânia à aplicação do S indica que a utilização de dose ideal de S em pastagens cultivadas na ausência de condições ambientais adversas e submetidas ao adequado manejo favorece o desenvolvimento e a produção de perfilhos e folhas. Desta forma, as pastagens fertilizadas podem se recuperar mais rapidamente após a colheita da forragem (pastejo ou mecânica), produzindo mais forragem para os animais.

As folhas do capim-tanzânia e do estilosante crescidos em suprimento adequado de S foram mais verdes nos dois crescimentos (Figura 3). Os valores de IRC nas folhas recém-expandidas do capim e do estilosante apresentaram relação significativa e positiva com a produção de massa seca na parte aérea (Figura 3C), indicando que a concentração de clorofila foi um fator que limitou a produção de massa seca, tanto na fase inicial de crescimento (1º corte) quanto na rebrotação (2º corte). O metabolismo do S é ligado ao metabolismo do carbono, como por exemplo nos sulfolípidos dos tilacóides e nos centros Ferro-S das enzimas participantes do fotossistema I (IMSANDE, 1998). Assim, o S desempenha papel fundamental e efetivo na coordenação e funcionamento do ciclo de Calvin com as reações luminosas nos cloroplastos (SAITO, 2004). Ahmad e Abdin (2000) também mostraram que a aplicação de S resultou em aumento na concentração de rubisco e de clorofila em genótipos de brássicas. De acordo com Ismande (1998), a coloração amarelada observada nas plantas deficientes em S ocorre devido à deficiência de clorofila. No presente trabalho, o teor de clorofila estimado pelo IRC (valor SPAD) se mostrou um bom indicador para identificar a deficiência de S, bem como para detectar as mudanças nutricionais ocasionadas pelo suprimento de S, tanto para gramínea quanto para a leguminosa forrageira (Figura 3).

As plantas de capim-tanzânia cultivadas em limitação de S e com sintoma visual de deficiência de S apresentaram valores de IRC de 20 unidades SPAD em ambos os crescimentos, enquanto os valores de IRC próximos a 40 unidades SPAD foram relacionados à máxima produção de massa seca tanto no primeiro quanto no segundo corte (Figura 3C). Lavres Jr., Monteiro e Schiavuzzo (2008) também relataram que o S alterou positivamente os valores SPAD em dois crescimentos do capim-marandu e valores de 40 unidades SPAD

foram relacionados à máxima produção de massa seca. Nas plantas de estilosante, os valores de IRC foram mais baixos no primeiro corte em comparação aos do segundo corte, tanto nas plantas com sintomas visuais de deficiência de S quanto nas plantas com máxima produção de massa seca (Figura 3D). No entanto, os valores de IRC superiores a 30 unidades SPAD nas folhas diagnósticas do estilosante amostradas nos dois cortes estiveram associados à alta produção de massa seca e à nutrição adequada em S.

Ao se considerar as raízes das plantas forrageiras, há carência de informação no que se refere ao efeito da disponibilidade do S nos atributos morfológicos e produtivos das raízes e na relação deles com morfologia, produção de massa seca e acúmulo do nutriente na parte aérea. Na maioria dos casos, a parte aérea é mais estudada porque é a fração da planta forrageira que é consumida pelos animais e também devido à dificuldade na coleta das raízes no solo e da avaliação da rizosfera. Embora não sejam consumidas, as raízes devem ser consideradas em virtude de sua elevada importância na capacidade de armazenar carboidratos e proteínas, o que influencia diretamente na rebrotação após desfolha da planta forrageira. O crescimento do sistema radicular influi diretamente na capacidade das plantas forrageiras de resistir a períodos de estresse hídrico e competir por nutrientes no solo (HERLING; RODRIGUES; LUZ, 2001). Assim, as alterações no crescimento das raízes em razão do suprimento de S, que raramente têm sido exploradas, necessitam de investigação mais aprofundada.

A maior disponibilidade de S favoreceu incrementos no comprimento radicular e acúmulo de massa seca tanto nas raízes do capim-tanzânia quanto do estilosante (Figura 4). A enorme diferença entre os valores do comprimento radicular das espécies estudadas ocorreram pois possuem tipos diferentes de raízes. O estilosante apresenta raízes do tipo pivotante, onde se percebe claramente uma única raiz principal e o capim-tanzânia apresenta raízes do tipo fasciculada sem uma única raiz principal, mas sim com várias ramificações. O comprimento radicular de ambas as espécies foi positivamente influenciado pelo fornecimento de S e correlacionado positivamente com o incremento na produção de massa seca das raízes e da parte aérea (Tabela 1).

A superfície das raízes, que é um dos mais importantes parâmetros morfológicos a se avaliar (pela considerável influência na extensão na qual o solo é explorado pelas raízes na busca de nutrientes e água) também foi significativamente influenciada pela disponibilidade de S. Nas raízes do estilosante, a superfície radicular aumentou com o maior fornecimento de S e foi positivamente relacionada com o incremento da massa seca nas raízes e parte aérea (Figura 4D e Tabela 1). Ao contrário, o capim-tanzânia teve a superfície radicular aumentada

pela limitação de S no meio de cultivo (Figura 4C). Esta resposta morfológica é considerada um mecanismo de adaptação típico de plantas crescidas em disponibilidade limitada de nutrientes, facilitando a exploração de maior volume de solo. Esta característica adaptativa do capim-tanzânia é particularmente importante em solos de baixa fertilidade em S pois o aumento da superfície radicular melhora a absorção de S e como consequência, pode conduzir à concentração mais elevada de S nas plantas. No capim-tanzânia, a superfície radicular foi negativamente relacionada com a produção de massa seca das raízes e da parte aérea (Tabela 1). Assim, a grande superfície radicular e a baixa produção de massa seca observada nas plantas de capim sob carência de S indicam a presença predominante de raízes mais finas (FITTER, 1996) buscando nutrientes em condições de baixa disponibilidade de S (Figura 4C e 4E).

Embora, as plantas de capim-tanzânia e estilósante tenham atingido a máxima produção de massa seca com as doses de S. A concentração e acúmulo de S responderam linearmente, indicando que valores mais altos da concentração de S poderiam ser obtidos com o fornecimento de doses mais elevadas de S (Figura 6). Todavia, esse aumento na concentração de S não estaria necessariamente relacionado com incremento da produção de massa seca e muito provavelmente o S seria acumulado na planta como reserva de S.

A concentração de S é um dos parâmetros utilizados na diagnose do estado nutricional das plantas (PUMPHREY; MOORE, 1965; SCHNUG; HANEKLAUS, 1998) e também para avaliar o valor nutricional das plantas forrageiras para o animal (QI; LU; OWENS, 1992; 1993). As concentrações de S nas plantas forrageiras são agrupadas em quatro categorias quanto às exigências nutricionais para os animais: $< 1,0 \text{ g kg}^{-1}$, indica deficiência para todos os ruminantes; $> 1,0 \text{ g kg}^{-1}$, indica nutrição satisfatória para bovinos de corte; $> 1,6 \text{ g kg}^{-1}$, indica nutrição satisfatória para ovinos adultos; $> 2,0 \text{ g kg}^{-1}$, nutrição satisfatória para vacas leiteiras e ovelhas (NRC 1984; 1985; 1989).

Ao se considerar o fornecimento de forragem visando atender a demanda de S pelos animais, para o capim-tanzânia foi necessária a aplicação de doses elevadas de S. A gramínea forrageira apresentou incrementos menores na concentração de S na parte aérea comparativamente à leguminosa forrageira, em resposta à aplicação de S (Figura 6). A leguminosa forrageira, embora seja mais exigente em S, apresentou concentrações mais elevadas de S que atendem as necessidades nutricionais em S dos animais. As gramíneas são naturalmente mais pobres em S do que as leguminosas (MARSCHNER, 2012). Deste modo, o uso de monocultivos de espécies de gramíneas forrageiras pode não atender a exigência em S dos animais. Assim, a utilização do consórcio de gramíneas com leguminosas, quando da

utilização da adubação com S, pode garantir melhor valor nutricional das forrageiras, em termos de S na alimentação dos ruminantes.

Como frequentemente, as plantas forrageiras constituem a única fonte de nutrientes para os animais sob pastejo, fica evidente a importância do manejo correto do suprimento de S para as pastagens, com os objetivos da maximização da produção forrageira e do adequado suprimento nutricional da forragem produzida visando o consumo dos animais.

3.5 Conclusões

O S afeta diretamente a emissão de folhas e de perfilhos, área foliar, comprimento e superfície radicular, aumentando a produção de massa seca da parte aérea e raízes do capim-tanzânia e do estilosante. A limitação de S altera a distribuição de fotossintatos entre a parte aérea e raízes das plantas de capim-tanzânia e estilosante, proporcionando maior produção de massa seca das raízes em relação à parte aérea. As plantas de capim-tanzânia aumentam a superfície radicular como mecanismo de adaptação à limitação de S no meio de cultivo. O IRC das folhas recém-expandidas se relaciona com a produção de massa seca da parte aérea, podendo ser utilizado para avaliar o estado nutricional em S no capim-tanzânia e no estilosante. A aplicação de S mostrou-se necessária para aumentar o crescimento e produção de massa seca do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão. Para garantir alta produção de forragem aliada ao melhor valor nutricional da forragem quanto às concentrações de S, pode-se sugerir a utilização destas espécies em consórcio.

Referências

- AHMAD, A.; ABDIN, M.Z. Interactive effect of sulphur and nitrogen on the oil and protein concentrations and on the fatty acid profiles of oil in the seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, Malden, v.185, p.49-54, 2000.
- AKMAL, M.; JANSSENS, M.J.J. Productivity and light use efficiency of perennial ryegrass with contrasting water and nitrogen supplies. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.88, p.143–155, 2004.
- COLEMAN, S.W. Plant–animal interaction. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.5, p.7–13, 1992.
- CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. Nitrogen and sulphur. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds) **Biochemistry and molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists: Rockville-MA, 2002. p.786–849.

DE BONA, F.D. **Nitrogênio e enxofre para gramínea forrageira: atributos do solo e aspectos metabólicos, nutricionais e produtivos da planta**. 2009. 124p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FITTER, A. Characteristics and functions of root systems. In: WASEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (eds) **Plant roots. The hidden half**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.1-20.

HAWKESFORD, M.J.; DE KOK, L.J. Managing sulphur metabolism in plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.29, p.382–395, 2006.

HERLING, V.R.; RODRIGUES, L.R.A.; LUZ, P.H.C. Manejo do pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM: PLANEJAMENTO E SISTEMAS DE PRODUÇÃO EM PASTAGENS. 18., 2001. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2001. p.157-192.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experimental Station, 1950. 347p. (Circular, 347).

IMSANDE, J. Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.103, p.139-144, 1998.

JUSZCZUK, I.M.; OSTASZEWSKA, M. Respiratory activity, energy and redox status in sulphur-deficient bean plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.74, p.245-254, 2011.

KOWALENKO, C.G. Response of forage grass to sulphur applications on coastal British Columbia soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.84, p.227–236, 2004.

LAVRES JR., J.; MONTEIRO, F.A.; SCHIAVUZZO, P.F. Concentração de enxofre, valor SPAD e produção do capim-Marandu em resposta ao enxofre. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.3, p.225-231, 2008.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.6, p.280-287, 2003.

MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2012. 651p.

MCKENZIE, F.R.; JACOBS, J.L.; KEARNEY, G. The long-term impact of nitrogen fertiliser on perennial ryegrass tiller and white clover growing point densities in grazed dairy pastures in south-western Victoria. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.53, p.1203–1209, 2002.

MURPHY, M.D.; COULTER, B.S.; NOONAN, D.G.; CONNOLLY, J. The effect of sulphur fertilisation on grass growth and animal performance. **Irish Journal of Agricultural & Food Research**, Dublin, v.41, p.1–15, 2002.

NRC- National Research Council. **Nutrient requirements of beef cattle**, Washington, D.C. National Academy of Sciences, 1984. p. 23-24.

_____. **Nutrient requirements of sheep**, Washington, D.C. National Academy of Sciences, 1985. p.15-16.

_____. **Nutrient requirements of dairy cattle**, Washington, D.C. National Academy of Sciences, 1989. p. 28-29.

PARSONS, A.J.; LEAFE, E.L.; COLLET, B.; STILLES, W. The physiology of grass production under grazing. I. Characteristics of leaf and canopy photosynthesis of continuously-grazed swards. **Journal of Applied Ecology**, Malden, v.20, p.117–126, 1983.

POPPI, D.P.; MINSON, D.J.; TERNOUTH, J.H. Studies of cattle and sheep eating leaf and stem fractions of grasses: I. The voluntary intake, digestibility and retention time in the reticulo-rumen. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 32, p. 99–108, 1980.

PREMAZZI, L.M., MONTEIRO, F.A.; CORRENTE, J.E. Tillering of Tifton 85 Bermudagrass in response to nitrogen rates and time of application after cutting. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, p.565–571, 2003.

PUMPHREY, F.V.; MOORE, D.P. Diagnosing sulfur deficiency of alfalfa (*Medicago sativa*) from plant analysis. **Agronomy Journal**, Madison, v.57, p.364-366, 1965.

QI, K.; LU, C.D.; OWENS, F.N.; LUPTON, C.J. Sulphate supplementation of Angora goats: Metabolic and mohair responses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, p.2828-2837, 1992.

QI, K.; LU, C.D.; OWENS F.N. Sulphate supplementation for growing goats: Effects on performance, acid-base balance, and nutrient digestibilities. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.71, p.1579-1587, 1993.

RECHCIGL, J.E. Sulphur fertilization improves bahiagrass pastures. **Better Crops Plant Food**, Norcross, v.75, p.22-24, 1991.

ROSSIELLO, R.O.P.; ARAÚJO, A.P.; MANZATTO, C.V.; FERNANDES, M.S. Comparação dos métodos fotoelétricos e da interseção na determinação de área, comprimento e raio médio radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, p.633-638, 1995.

SAITO, K. Sulfur assimilatory metabolism, the long and smelling road. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, p. 2443–2450, 2004.

SANTOS, A.R.; MONTEIRO, F.A. Produção e perfilhamento de *Brachiaria decumbens* Stapf. em função de doses de enxofre. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, p.689-692, 1999.

SAS Institute Inc., **SAS OnlineDoc® 9.1.2**. Cary, NC: SAS Institute Inc. JMP Statistics and Graphics Guide, version 5. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.

SCHNUG, E.; HANEKLAUS, S. Diagnosis of Sulphur Nutrition. In: SCHNUG, E. (Ed.). **Sulphur in agrosystems**, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 1-38.

SINCLAIR, A.G.; SMITH, L.C.; MORRISON, J.D.; DODDS, K.G. Effects and interactions of phosphorus and sulphur on a mown white clover/ryegrass sward. 1. Herbage dry matter production and balanced nutrition. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Oxon, v.39, p.421-433, 1996.

TABATABAI, M.A. Sulfur. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. pt 2. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.501-538.

TALLEC, T.; DIQUELÓU, S.; LEMAUVIEL, S.; CLIQUET, F.; LESUFFLEUR, F.; OURRY, A. Nitrogen:sulphur ratio alters competition between *Trifolium repens* and *Lolium perenne* under cutting: Production and competitive abilities. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v.29, p.94-101, 2008.

WANG, S.P.; WANG, Y. F.; CUI, X.Y.; CHEN, Z. Z.; SCHNUG, E.; HANEKLAUS, S. Sulphur concentration of soils and plants and its requirement for ruminants in the Inner Mongolia steppe of China. **Grass and Forage Science**, Malden, v.56, p.418-422, 2001.

_____. Effects of sulphur supply on the morphology of shoots and roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Grass and Forage Science**, Malden, v.58, p.160-167, 2003.

WULFF-ZOTTELE, C.; GATZKE, N.; KOPKA, J.; ORELLANA, A.; HOEFGEN, R.; FISAHN, J.; HESSE, H. Photosynthesis and metabolism interact during acclimation of *Arabidopsis thaliana* to high irradiance and sulphur depletion. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, p. 1974–1988, 2010.

4 INTERFERÊNCIA DO SUPRIMENTO DE ENXOFRE NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM CAPIM-TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO

Resumo

A aplicação de enxofre (S) para as plantas forrageiras pode alterar o metabolismo do nitrogênio (N) e mudanças na relação N:S potencialmente afetam a produção da forragem. Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação para investigar o efeito da aplicação de S, em condições de baixo, intermediário e alto suprimento nutricional no metabolismo do N e as consequentes alterações causadas na composição e concentrações de aminoácidos solúveis e nas concentrações de N total, S total, N-nitrato, S-sulfato e proteínas solúveis nas folhas das plantas forrageiras capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) e estilosante Mineirão (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão). Deste modo, foram fornecidas as doses de 0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L⁻¹ de S para o capim-tanzânia e 0,10; 0,70; 1,30; 1,90 e 2,50 mmol L⁻¹ de S para o estilosante. As plantas de ambas as espécies foram submetidas a dois cortes. A baixa disponibilidade de S ocasiona o desequilíbrio nutricional com o N nas plantas de capim-tanzânia e estilosante evidenciado por alta relação N:S no tecido vegetal e altas concentrações de N-nitrato e aminoácidos livres. Sob limitação de S, as plantas de capim-tanzânia apresentam predomínio de asparagina na composição aminoacídica enquanto no estilosante ocorre a predominância de arginina. O aumento da aplicação de S regula o balanceamento da relação N:S em valores próximos a 20:1, que proporciona concentrações de N e S mais apropriadas à síntese de proteínas e à produção de forragem nas plantas das duas espécies forrageiras.

Palavras-chave: Adubação sulfurada; Composição aminoacídica; Concentração de nitrato; Forrageiras tropicais; Relação N:S

Abstract

Increasing the supply of sulfur (S) to forage plants can change their nitrogen (N) metabolism, causing changes in the N:S ratio that can potentially affect forage production. Two greenhouse experiments were carried out to examine how N metabolism in the leaves of two forage species, Guinea grass (*Panicum maximum* cv. Tanzania) and stylo (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão), varied under low, intermediate and high levels of S, and to quantify related changes in the composition and concentrations of soluble amino acids and in the concentrations of total N, total S, N-nitrate, S-sulfate, and soluble proteins. Guinea grass was cultivated with 0.10; 0.55; 1.00; 1.45 and 1.90 mmol L⁻¹ S, while stylo was cultivated with 0.10; 0.70; 1.30; 1.90 and 2.50 mmol L⁻¹ S. Plants of both species were harvested on two occasions. Low S availability caused nutritional imbalance with N in Guinea grass and stylo plants, as shown by a high N:S ratio and high concentrations of N-nitrate and free amino acids in plant tissues. Among amino acids, asparagine predominated in S-limited guineagrass and arginine in S-limited stylo. Increased S supply regulates N:S ratio at values close to 20:1, which provides N and S concentrations that are more suitable for protein synthesis and forage production in plants of both species.

Keywords: Amino acid composition; Nitrate concentration; N:S ratio; Sulfur fertilization; Tropical forage

4.1 Introdução

O enxofre (S), além de ser essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, tem seu metabolismo intimamente ligado ao do nitrogênio (N), de modo que mudanças na relação N:S potencialmente afetam o valor nutricional das plantas forrageiras. A relação desses elementos nas plantas bem nutridas ocorre dentro de limites estreitos, refletindo a abundância da presença de S nos aminoácidos e proteínas (CRAWFORD et al., 2000). Esse equilíbrio, conjugado com as funções do N, indica que o S deve integrar o programa de nutrição vegetal balanceada para atender a segurança alimentar.

Nas plantas, o S é absorvido pelas raízes como sulfato, transportado via xilema para as folhas, onde é reduzido e incorporado no aminoácido cisteína. Esse aminoácido segue para conversão a metionina e/ou proteínas. Parte das proteínas vegetais contém aminoácidos sulfurados e, por essa razão, a disponibilidade conjunta de N e S assume grande importância no processo de síntese proteica e crescimento e desenvolvimento das plantas. A coordenação existente entre as vias metabólicas do N e do S deve assegurar os fluxos destes elementos de modo a satisfazer os requisitos mínimos de aminoácidos para o funcionamento satisfatório da síntese de proteínas.

A cisteína desempenha papel central na síntese de compostos orgânicos de S e a sua síntese é a mais importante reação de acoplamento direto entre o metabolismo do N e do S na planta (BRUNOLD, 2003). Além de regular a biossíntese da metionina, a cisteína é precursora de glutatona (GSH), fitoquelatinas e co-fatores (Ferro-S), vitaminas essenciais como biotina e tiamina e ésteres de S (Coenzima A) (DROUX, 2004; SAITO, 2004). A metionina, por sua vez, é um importante aminoácido essencial sulfurado que está presente em pequenas quantidades nas espécies vegetais. Esse aminoácido recebe o esqueleto de carbono (C) a partir do aspartato, enquanto que a porção de S deriva da cisteína.

Diversos estudos demonstram a complexa interação regulatória entre o metabolismo do N e a assimilação do S (PROSSER et al., 1997; MIGGE et al., 2000; HAWKESFORD; DE KOK, 2006). Durante limitação prolongada de S para as plantas, mudanças nas reservas de vários metabólitos seguidos por distúrbios no metabolismo do N foram reportados na literatura, como por exemplo, a inibição da síntese de proteínas e acumulação de aminoácidos livres tais como asparagina, arginina e glutamina (MIGGE et al., 2000; NIKIFOROVA et al., 2006; DE BONA et al., 2011) e baixas concentrações de cisteína e metionina no tecido vegetal (NIKIFOROVA et al., 2006). Além disso, a elevada relação N:S pode revelar

acúmulo de N na forma não-proteica, particularmente nas formas de nitrato (NO_3^-) e N orgânico solúvel (HAQ e CARLSON, 1993; PROSSER et al., 1997).

No caso de plantas forrageiras, o conhecimento das alterações metabólicas e nutricionais devido a deficiência de S é importante porque concentrações sub-ótimas de aminoácidos essenciais e/ou acúmulo de produtos secundários das rotas assimilatórias de N e de S podem diminuir o valor nutricional da forragem e a produção de massa seca. Sabendo-se que o metabolismo primário varia entre espécies vegetais, no presente estudo investigaram-se o capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) e o estilosante Mineirão (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão) quanto ao efeito do suprimento de S na assimilação e metabolismo do N.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Condições de crescimento, tratamentos e delineamento experimental

Plantas de capim-tanzânia e estilosante Mineirão foram crescidas durante o verão em casa de vegetação [temperatura média de 30 °C e fotoperíodo de 16/8 h (dia/noite)], em vasos plásticos com capacidade de 3,6 L, contendo quartzo moído como substrato inerte. As sementes do capim e do estilosante foram germinadas em bandejas contendo areia lavada com água deionizada e fornecimento diário de água deionizada. As plântulas de ambas as espécies foram transplantadas para os vasos plásticos aos 15 dias após a semeadura. Cinco plantas de capim ou de estilosante foram crescidas em cada vaso.

O fornecimento de S foi diferenciado entre as espécies porque o requerimento nutricional de S das leguminosas é mais elevado. O S foi suprido na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) para simular condição de nutrição baixa, intermediária e alta de S para as plantas. Cinco doses de S na solução nutritiva foram testadas para o capim-tanzânia (0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L⁻¹) e para o estilosante (0,10; 0,70; 1,30; 1,90 e 2,50 mmol L⁻¹). As unidades experimentais de cada espécie foram distribuídas em blocos casualizados, com quatro repetições. A composição da solução nutritiva para os demais nutrientes continha 1 mmol L⁻¹ de KH_2PO_4 , 5 mmol L⁻¹ de KCl, 2 mmol L⁻¹ de KNO_3 , 5 mmol L⁻¹ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 9 mmol L⁻¹ de NH_4NO_3 , 46 µmol L⁻¹ de H_3BO_3 , 9 µmol L⁻¹ de MnCl_2 , 0,73 µmol L⁻¹ de ZnCl_2 , 0,30 µmol L⁻¹ de CuCl_2 , 0,11 µmol L⁻¹ de $\text{H}_2\text{MoO}_4 [\text{H}_2\text{O}]$ e 100 µmol L⁻¹ de Fe(III)-EDTA. O S na solução nutritiva foi fornecido por meio do sal MgSO_4 . A concentração de magnésio (Mg^{2+}) foi ajustada em todas as doses de S utilizando-se uma solução com MgCl_2 de modo que a concentração final de Mg^{2+} foi igual a 2 mmol L⁻¹. O

crescimento das plântulas até o quinto dia após o transplante ocorreu em solução nutritiva diluída com concentração dos nutrientes correspondente a 25% da completa. Após esse período, aplicou-se a solução nutritiva definitiva, a qual foi renovada a cada 14 dias, para ambas as espécies.

Durante o período experimental foram realizadas duas colheitas de plantas de cada espécie. A parte aérea do capim foi colhida aos 35 dias após o transplante (corte 5 cm acima da junção parte aérea-raízes) e aos 30 dias de rebrotação (corte rente à base da planta). Em ambos os cortes, todas as plantas foram colhidas quando as folhas maduras do capim em estado fenológico mais avançado iniciaram a processo de senescência, independente da dose de S aplicada. A parte aérea do estilante foi colhida aos 50 dias após o transplante (corte 20 cm acima da base da planta) e aos 27 dias após a primeira colheita (corte rente à base da planta). O período de crescimento e desenvolvimento de 50 dias até a realização do primeiro corte foi necessário para garantir vigor de rebrotação e persistência das plantas após a desfolhação. Em ambos os cortes, todas as plantas do estilante foram colhidas quando as plantas em estágio fenológico mais avançado atingiram 60 cm de altura, independente do suprimento de S.

As duas lâminas foliares mais jovens totalmente expandidas do capim-tanzânia e as três folhas trifolioladas completamente expandidas contadas a partir do ápice da planta no estilante correspondem às folhas diagnósticas dessas espécies. Amostras dessas folhas foram coletadas nos dois cortes visando determinar as concentrações de aminoácidos e proteína solúveis. A massa fresca amostrada foi colocada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada em *freezer* a -80°C até o momento das análises.

O material vegetal colhido por ocasião dos cortes das plantas foi colocado para secar em estufa de ventilação forçada a 65°C até atingir massa constante, com posterior pesagem em balança de precisão para a obtenção dos resultados de produção de massa seca da parte aérea das plantas. Amostras secas de lâminas de folhas diagnósticas foram separadas e moídas em moinho do tipo Wiley para posterior determinação das concentrações de enxofre total (S), nitrogênio total (N), N-nitrato (NO_3^-) e S-sulfato (SO_4^{2-}) no tecido vegetal.

4.2.2 Concentrações de N total, S total, N-nitrato e S-sulfato no tecido vegetal

As concentrações totais de N e S nas folhas diagnósticas das plantas foram determinadas conforme metodologia descrita por Nelson e Sommers (1973) e Tabatabai (1982), respectivamente. O extrato para a determinação do N foi obtido via digestão sulfúrica, a partir do qual foi determinado o N pelo método analítico semi-micro Kjeldahl. O extrato

para determinação do S foi obtido via digestão nítrico-perclórica, a partir do qual foi determinado o S pelo método da turbidimetria do cloreto de bário. A relação N:S nas folhas diagnósticas foi calculada pela razão entre a concentração de N total e S total.

A concentração de S-sulfato determinada nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia e do estilossante Mineirão seguiu a metodologia modificada de Sinclair (1974). Assim, colocou-se 1 g de massa seca em erlenmeyer e adicionaram-se 25 mL de solução extratora contendo ácido acético glacial, ácido clorídrico e ácido ortofosfórico. Após 30 minutos de agitação (200 rpm) em mesa agitadora, filtrou-se o conteúdo do erlenmeyer através de papel de filtro e pipetaram-se 2 mL desse extrato para um tubo que foi colocado em destilador de S adaptado de Johnson e Nishita (1952), adicionando-se 4 mL de uma solução redutora à base dos ácidos iodídrico, hipofosforoso e fôrmico. Na outra extremidade do aparelho colocou-se um tubo com 40 mL de água deionizada + 10 mL de uma solução receptora à base de acetato de sódio e zinco $[\text{NaOAc-Zn(OAc)}_2]$. O extrato foi destilado por uma hora em bloco de aquecimento a 100°C, onde o S-sulfato contido no extrato foi convertido a sulfeto, que foi coletado na solução receptora. Procedeu-se a transferência da solução receptora contendo o sulfeto para um balão de 100 mL ao que se adicionaram 10 mL de *p*-aminodimetilanilina + 2 mL de sulfato férrico e completou-se o volume com água deionizada. Após 20 minutos de repouso, procedeu-se a leitura do S-sulfato em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 670 nm.

A concentração de N-nitrato foi determinada segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995), utilizando-se 0,1 g de massa seca e 10 mL de solução extratora de KCl 1 mol L⁻¹. O extrato foi filtrado em papel e efetuou-se a destilação em microdestilador Kjeldahl modificado como descrito por Tedesco e Gianello (1979). Realizou-se a quantificação de N na forma de nitrato (N-NO₃⁻) + nitrito (N-NO₂⁻) do destilado por meio de titulação com solução padronizada de H₂SO₄ 0,0025 mol L⁻¹. Considerou-se desprezível a concentração de N-NO₂⁻ presente nas amostras e os resultados foram expressos como N-NO₃⁻.

4.2.3 Aminoácidos livres no tecido vegetal

O extrato para determinação de aminoácidos na planta foi obtido por meio de maceração do material vegetal fresco previamente coletado e armazenado em *freezer* -80°C utilizando-se almofariz e N₂ líquido com adição de solução de CH₂O₂ 10 mmol L⁻¹. Os aminoácidos foram determinados empregando derivatização pré-coluna com ortoftaldeído (OPA) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O cromatógrafo a líquido da marca Shimadzu® era equipado por módulo de comunicação CBM 10-A, módulo

de controle de temperatura CTO 10-A, injetor automático SIL 10-A, bomba de HPLC 10-AS, forno CRB-6A, coluna de fase reversa C-18 150 x 4-6 mm (Spheriforb ODS 2) e detector de fluorescência RF 10-A. Para a detecção pela fluorescência adotaram-se os comprimentos de onda de excitação de 340 nm e de emissão de 445 nm. Os solventes usados foram: (A) = acetato de sódio (pH 5-7) 0,05 mol L⁻¹ + 3 % v/v de tetrahidrofurano (THF) e (B) = metanol + 5 % THF. O tempo de separação dos 19 aminoácidos analisados foi de aproximadamente 30 minutos por amostra. A concentração de aminoácidos foi determinada por meio do programa computacional integrador de áreas de pico (Spectra Physics SP 4270).

4.2.4 Proteínas solúveis no tecido vegetal

Os extratos utilizados na determinação da proteína solúvel foram preparados utilizando 1 g de material vegetal fresco congelado a -80°C. O material vegetal foi triturado em almofariz e pistão de porcelana com N₂ líquido e adição de polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP) na quantidade 20% (massa/massa) da amostra. O tampão de extração utilizado foi fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5) suplementado com 1 mmol L⁻¹ de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) e 3 mmol L⁻¹ de ditioneína (DTT). Os extratos foram centrifugados a 10.000 x g durante 30 min a 4°C.

A concentração de proteína solúvel nos extratos foi determinada em triplicata pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Company) como padrão. Os resultados foram expressos em proteína solúvel acumulada na planta multiplicando-se a concentração de proteína solúvel (mg g⁻¹ de massa fresca) pela massa fresca total da planta (g planta⁻¹).

4.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SAS versão 9.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004). A análise de variância foi realizada para cada espécie forrageira. Quando houve significância do teste F para as doses de S, realizou-se o estudo de regressões de primeiro e de segundo grau e exponenciais, utilizando o comando GLM (General Linear Model). Os símbolos (*) e (**) nas equações de regressão indicam o nível de significância ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$), respectivamente, dos coeficientes correspondentes. Avaliou-se também o efeito do S nas concentrações dos aminoácidos livres por meio do estudo da comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

4.3 Resultados

4.3.1 Produção de massa seca e concentrações de S total, S-sulfato, N total e N-nitrato no tecido vegetal

O suprimento de S incrementou a produção de massa seca da parte aérea do capim-tanzânia e do estilosante no primeiro e no segundo corte das plantas (Figura 1). A aplicação de $1,26 \text{ mmol L}^{-1}$ de S foi responsável pela máxima produção de massa seca da parte aérea do capim-tanzânia, independente do corte considerado. As plantas de estilosante no primeiro corte apresentaram aumento linear e positivo da produção de massa seca da parte aérea de acordo com a disponibilidade de S. No segundo corte, a adição de doses de S superiores a $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$ foram suficientes para promover a máxima produção de massa seca da parte aérea do estilosante.

Figura 1- Produção de massa seca (A, B) na parte aérea do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão no primeiro e segundo corte das plantas em função do suprimento de doses de S na solução nutritiva. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média, ($n=20$)

As concentrações de S total e S-sulfato nas folhas diagnósticas coletadas nos dois cortes tanto do capim-tanzânia quanto do estilosante Mineirão aumentaram significativamente com a aplicação de S (Figuras 2C, 2D, 3C e 3D). No capim-tanzânia amostrado no primeiro e segundo cortes, o fornecimento de $1,90 \text{ mmol L}^{-1}$ de S aumentou em, respectivamente, 58% e 68% as concentrações de S total (Figura 2C) nas folhas recém-expandidas comparativamente às plantas cultivadas em $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de S. De modo geral, as concentrações de S total nas folhas diagnósticas do capim foram mais altas ao final do segundo período de crescimento das plantas. As concentrações de S total nas folhas diagnósticas amostradas no primeiro corte do estilosante atingiram máximo valor com o suprimento de aproximadamente $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$ de S na solução nutritiva (Figura 2D). Doses de S que excederam esse limite não alteraram

significativamente as concentrações de S no tecido vegetal das folhas diagnósticas do estilósante no primeiro ciclo de crescimento. Por outro lado, nas folhas diagnósticas no segundo corte, as concentrações de S total responderam linear e positivamente ao suprimento de S na solução nutritiva.

Figura 2 - Concentrações de nitrogênio total (A, B) e enxofre total (C, D) e relação N:S (E, F) nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia e do estilósante Mineirão coletadas no primeiro e segundo corte das plantas em resposta a aplicação de doses de S. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média, (n=20)

As plantas de capim crescidas em $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de S apresentaram apenas 2% do S total acumulado como S-sulfato, para ambos os cortes. No entanto, com a aplicação de $1,90 \text{ mmol L}^{-1}$ de S, o S-sulfato respondeu por 4% e 12% do S total, no primeiro e segundo corte do capim, respectivamente. As plantas de estilosante crescidas em $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ comparativamente às crescidas em $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de S aumentaram a participação de S-sulfato no S total de 1 para 27%, nas folhas coletadas no primeiro corte, e de 3 para 23%, na segunda colheita das plantas.

Figura 3 - Concentrações de N-nitrato (A, B), S-sulfato (C, D) e aminoácidos livres totais (E, F) nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão coletadas no primeiro e segundo corte das plantas em resposta a aplicação de doses de S. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média, (n=20)

O metabolismo do N foi afetado significativamente pela aplicação de S tanto na gramínea (capim-tanzânia) quanto na leguminosa (estilosante) forrageira. Em ambas as espécies, o fornecimento de S promoveu o decréscimo significativo nas concentrações de N-nitrato (Figuras 3A e 3B).

De fato, as concentrações de nitrato nas plantas de capim deficientes em S foram seis e três vezes mais elevadas do que nas plantas suficientemente nutridas com S ($1,00 \text{ mmol L}^{-1}$), no primeiro e segundo cortes, respectivamente, indicando que a redução do N-nitrato possivelmente foi limitada pela baixa disponibilidade de S às plantas. O estilosante em condição de deficiência de S acumulou aproximadamente duas vezes mais N-nitrato do que as plantas adequadamente nutridas com S ($1,30 \text{ mmol L}^{-1}$), em ambos os cortes.

A concentração de N-total nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia foi mais elevada nas plantas cultivadas em $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de S (condição de deficiência em S) do que nas demais doses, em ambos os cortes (Figura 2A). O aumento nas doses de S favoreceu o crescimento e produção de massa seca do capim (Figura 1A), o que resultou em diluição do N, que se refletiu no decréscimo das concentrações de N nas folhas diagnósticas. Esse efeito da diluição do N, devido ao maior crescimento das plantas com suprimento de altas doses de S também foi verificado no estilosante no segundo corte (Figura 2B). No primeiro corte do estilosante houve incremento da concentração de N-total com o aumento nas doses de S aplicadas.

Plantas de capim crescidas sob dose limitante de S ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) apresentaram relação N:S de aproximadamente 60:1, no primeiro corte, e cerca de 70:1, no segundo corte. Similar ao capim, o estilosante crescido sob limitação de S apresentou relação N:S de aproximadamente 60:1 em ambos os cortes. Independente do período de crescimento, o fornecimento de $1,00$ até $1,90 \text{ mmol L}^{-1}$ de S para o capim e de $1,30$ até $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de S para o estilosante, reduziu a relação N:S para valores próximos de 20:1 nas folhas diagnósticas das plantas (Figuras 2E e 2F).

4.3.2 Concentrações e distribuição da composição dos aminoácidos livres

As plantas de capim-tanzânia e de estilosante crescidas sob limitação nutricional de S apresentaram mais alta concentração de aminoácidos livres totais nas folhas diagnósticas do que nas condições de nutrição intermediária e alta desse nutriente (Figura 3E e 3F). As plantas de capim-tanzânia crescidas com $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de S apresentaram concentrações de aminoácidos livres totais de cerca de 80 e 90% superiores se comparadas às plantas supridas com doses de S mais elevadas, no primeiro e segundo cortes, respectivamente. As plantas de

estilosante crescidas em $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de S apresentaram concentrações de aminoácidos solúveis totais aproximadamente 85% maiores do que plantas crescidas nas demais doses de S aplicadas, em ambos os cortes. A alteração da concentração de aminoácidos livres em consequência da limitação de S foi acompanhada por expressivo aumento da concentração de asparagina e de arginina nas folhas diagnósticas do capim e do estilosante, respectivamente (Tabela 1).

Tabela1- Concentrações dos aminoácidos livres nas folhas diagnósticas de capim-tanzânia e estilosante crescidos sob condições de fornecimento baixo ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), intermediário ($1,00$ e $1,30 \text{ mmol L}^{-1}$) e alto ($1,90$ e $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$) de S

Aminoácidos (mg kg ⁻¹ MF)	capim-tanzânia			estilosante Mineirão		
	Baixo	Intermediário	Alto	Baixo	Intermediário	Alto
Ac. Aspártico	188,2a	103,1c	138,7b	92,6b	128,1a	126,5a
Ac.Glutâmico	141,1c	243,9b	370,6a	206,0b	313,2a	331,8a
Alanina	185,3a	96,0b	97,4b	47,2b	81,8a	93,3a
Arginina	153,0c	404,1b	613,6a	8.307,1a	383,7b	283,7b
Asparagina	16.209,0a	230,5b	178,3c	258,4a	97,4 b	77,1b
Cisteína	29,5c	53,3b	74,3a	19,8b	35,8a	10,8c
Glutamina	118,5a	54,8b	62,6b	30,7b	41,1a	36,5a
Glicina	161,2a	18,2c	34,0b	12,4a	9,3a	12,0a
Histidina	36,3b	26,1c	40,8a	100,6a	20,0b	25,0b
Isoleucina	16,9c	43,3b	75,5a	30,7a	9,9b	12,3b
Leucina	34,6c	87,1b	152,0a	16,8b	17,6b	24,5a
Lisina	30,7a	13,6b	24,4a	133,6a	16,1b	18,4b
Metionina	16,1c	131,2b	319,0a	14,6a	15,3a	7,1b
Fenilalanina	29,0c	66,3b	148,5a	12,7a	7,3b	11,8a
Prolina	80,1a	42,1b	96,8a	35,3a	34,2a	45,0a
Serina	209,0a	89,8b	85,0b	64,3a	54,1a	57,2a
Treonina	76,3a	26,0b	34,6b	36,5a	14,6c	23,2b
Tirosina	86,3c	169,6b	280,8a	102,3a	83,2b	86,6b
Valina	88,2c	119,2b	229,9a	11,8b	11,9b	17,3a
Total	17.889,3a	2.018,2b	3.056,8b	9.533,4a	1.374,6b	1.300,1b

Os valores representam a média dos dois cortes pois não houve diferença entre os cortes (n=8). Letras distintas na linha e para cada espécie indicam médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

A análise detalhada dos principais aminoácidos essenciais livres no tecido vegetal das folhas diagnósticas de capim-tanzânia mostrou que a concentração do aminoácido asparagina aumentou aproximadamente 90 vezes nas plantas supridas com a dose de $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ comparativamente à dose de S de $1,90 \text{ mmol L}^{-1}$. Além da asparagina, a limitação de S também promoveu o incremento da concentração dos aminoácidos alanina, glutamina, glicina, prolina, serina, treonina e ácido aspártico nas folhas diagnósticas do capim (Tabela 1). Nota-se que o aumento do suprimento de S para o capim promoveu incrementos nas concentrações dos aminoácidos metionina e cisteína, que contém esse elemento em sua constituição. Nas

folhas diagnósticas de capim deficiente em S os aminoácidos mais abundantes em ordem decrescente de concentração foram asparagina > serina > ácido aspártico > alanina > glicina > arginina > ácido glutâmico > glutamina. Mediante o aumento do fornecimento de S para $1,90 \text{ mmol L}^{-1}$, as concentrações dos aminoácidos totais diminuíram (Figura 3E) e a distribuição em ordem decrescente dos aminoácidos com maior ocorrência foi arginina > ácido glutâmico > metionina > tirosina > valina > asparagina > leucina > fenilalanina (Tabela 1). As concentrações dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) nas folhas do capim-tanzânia aumentaram expressivamente com o fornecimento das doses intermediária ($1,00 \text{ mmol L}^{-1}$) e alta ($1,90 \text{ mmol L}^{-1}$) de S. As concentrações de metionina nas plantas de capim crescidas em intermediário e alto suprimento de S foram, respectivamente, 88 e 95% maiores do que nas plantas deficientes em S. As concentrações de cisteína no tecido vegetal da gramínea aumentaram 45 e 60% com fornecimento intermediário e alto de S, respectivamente, quando comparado às plantas deficientes em S.

As plantas de estilosante com limitação no fornecimento de S ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) apresentaram concentrações de arginina nas folhas diagnósticas aproximadamente 30 vezes maiores do que plantas crescidas com a dose mais alta de S ($2,50 \text{ mmol L}^{-1}$). Análogo à concentração de arginina, a limitação de S também incrementou a concentração dos aminoácidos asparagina, histidina, isoleucina, lisina, treonina e tirosina nas folhas diagnósticas do estilosante (Tabela 1). Nas folhas diagnósticas do estilosante deficiente em S os aminoácidos livres encontrados em mais alta concentração, em ordem decrescente foram arginina > asparagina > ácido glutâmico > lisina > treonina > histidina. Com o aumento do fornecimento de S para $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$, as concentrações dos aminoácidos livres totais nas folhas diagnósticas da leguminosa foram mais baixas (Figura 3F), e esta sequência foi alterada, sendo os três aminoácidos mais abundantes ácido glutâmico > arginina > ácido aspártico. As concentrações dos aminoácidos sulfurados cisteína e metionina foram baixas, mesmo nas plantas crescidas sob alta dose de S ($2,50 \text{ mmol L}^{-1}$), o que demonstra baixa resposta desses parâmetros à adição de S nessa espécie.

4.3.3 Proteína solúvel acumulada

A aplicação de S incrementou o acúmulo de proteína solúvel tanto na gramínea quanto na leguminosa forrageira em ambos os cortes das plantas (Figura 4). O valor máximo de proteína solúvel na parte aérea do capim foi alcançada com a disponibilidade intermediária de S de $1,21$ e $1,32 \text{ mmol L}^{-1}$, no primeiro e segundo cortes, respectivamente.

A quantidade acumulada de proteína solúvel do estilósante no primeiro corte atingiu valor máximo com o suprimento $2,12 \text{ mmol L}^{-1}$ de S na solução nutritiva (Figura 4 B). No segundo corte, o acúmulo de proteína solúvel na parte aérea do estilósante foi cerca de quatro vezes superior ao primeiro corte e atingiu acúmulo máximo e constante com o suprimento de aproximadamente $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$ de S na solução nutritiva.

Figura 4- Conteúdo de proteínas solúveis (A e B) na parte aérea do capim-tanzânia e do estilósante Mineirão na ocasião do primeiro e segundo corte das plantas, em resposta a aplicação de doses de S. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média, (n=20)

4.3.4 Relação N:S e produção de forragem

Um dos índices mais comuns para avaliar o estado nutricional das plantas quanto ao S é a relação N:S do tecido vegetal. Os valores da relação N:S de aproximadamente 20:1 foram associados às máximas produções de massa seca da parte aérea tanto no capim-tanzânia quanto no estilósante (Figura 5).

Figura 5- Relação N:S nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia (A) e do estilósante Mineirão (B) associada à máxima produção de massa seca da parte aérea das plantas. Resultados correspondem aos valores das respectivas variáveis de todas as doses de S testadas nos dois períodos de crescimento das plantas, (n= 40).

4.4 Discussões

Embora as concentrações de S sejam muito menores do que as de N no tecido vegetal, a disponibilidade adequada desse elemento é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas superiores devido às ações de regulação associadas ao metabolismo do N (DUBOUSSET et al., 2009; KAUR et al., 2010). No presente estudo, verifica-se claramente a interferência da limitação de S nos processos de assimilação, metabolismo e incorporação do N em proteínas nas plantas de capim e de estilosante. Assim, plantas de capim e de estilosante deficientes em S apresentaram alta relação N:S no tecido foliar (60:1 e 70:1) e acúmulo de nitrato e aminoácidos livres, o que caracteriza o desbalanço metabólico da planta (DIJKSHOORN; VAN WIJK, 1967). O aumento de nitrogênio não assimilado (N-nitrato) e de aminoácidos livres é atribuído à interrupção parcial das rotas metabólicas de assimilação e incorporação do N, o que pode ser observado pela baixa concentração de proteína solúvel e reduzida produção de massa seca das plantas do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão crescidas em condições sub-ótimas de S.

O acentuado incremento de N-nitrato acumulado nas plantas de capim e de estilosante crescidas com baixa disponibilidade de S corroboram resultados reportados para outras espécies vegetais em condição de deficiência de S, tais como o de Friedrich e Schrader (1978) com milho (*Zea mays*), o de Migge et al. (2000) com fumo (*Nicotiana tabacum*), o de Prosser et al. (2001) com espinafre (*Spinacea oleraceae*) e de De Bona et al. (2011) com cevada (*Hordeum vulgare*). Outros estudos têm indicado que o suprimento baixo de S às plantas afeta negativamente a atividade da enzima redutase do nitrato (MIGGE et al., 2000; DE BONA et al., 2011), o que causa o acúmulo de N-nitrato no tecido vegetal. Segundo Migge et al. (2000), a diminuição da expressão e atividade da redutase do nitrato em plantas com limitação de S pode estar relacionada ao provável efeito de repressão mediado pelo acúmulo de aminoácidos no tecido vegetal. Deve-se salientar que alta concentração de N-nitrato nas plantas forrageiras pode depreciar consideravelmente o valor nutricional da pastagem, uma vez que a dieta animal com alto teor de N-nitrato pode causar intoxicação e o problema conhecido como metahemoglobinemia no animal (WRIGHT; DAVISON, 1964).

De fato, a limitação nutricional em S promoveu expressivo aumento na concentração de aminoácidos solúveis no tecido das plantas de capim-tanzânia e de estilosante. Esse incremento de aminoácidos solúveis no tecido vegetal ocorreu principalmente com o aminoácido arginina no estilosante e asparagina no capim-tanzânia. Nas plantas, a asparagina e arginina representam importantes compostos nitrogenados de reserva e de transporte de N

solúvel (LEA, 1993). O incremento nas concentrações de asparagina e arginina na situação de deficiência de S possivelmente é uma alternativa fisiológica e metabólica da planta para alocação do N reduzido excedente (como o N reduzido derivado da redução do N-nitrato que não pode ser utilizado na biossíntese de proteína) do metabolismo primário nas folhas, a fim de manter o equilíbrio de N:S adequado no tecido vegetal durante o período de carência de S.

O tipo de aminoácido que mais se acumula durante a deficiência de S nas plantas parece ser dependente da espécie vegetal. Assim, estudos envolvendo as gramíneas temperadas azevém-perene (*Lolium perene*) e cevada demonstraram que a limitação de S resultou no aumento da concentração dos aminoácidos asparagina e ácido aspártico (BOLTON; NOWAKOWSKI; LAZARUS, 1976; COWLING; BRISTOW, 1979; MILLARD; SAHARP; SCOTT, 1985; KARMOKER et al., 1991). Por outro lado, espécies como fumo, espinafre e beterraba (*Beta vulgaris*) apresentaram incrementos expressivos na concentração do aminoácido arginina, quando crescidas em substrato com baixa disponibilidade de S (MIGGE et al., 2000; THOMAS et al., 2000; PROSSER et al., 2001). Nikiforova et al. (2006), trabalhando com plantas de *Arabidopsis* em condição de carência de S no meio de cultivo, relataram aumento na concentração dos aminoácidos serina e O-acetilserina.

Aparentemente os fluxos de N e de C que, durante a limitação de S não podem ser metabolizados na biossíntese de aminoácidos contendo S, são reorientados para distintas rotas fisiológicas e bioquímicas de síntese de compostos, em função da espécie vegetal. A mais alta concentração de asparagina no capim-tanzânia sugere que a deficiência de S nessa espécie afeta majoritariamente as rotas de biossíntese da metionina e aspartato, as quais são conectadas por uma complexa rede regulatória envolvendo relações negativas de *feedback* (AZEVEDO et al., 1997). Uma vez que a limitação de S causou decréscimo nas concentrações do aminoácido cisteína no capim-tanzânia, especula-se que a conversão de cisteína e de O-fosfohomoserina em cistationina, na biossíntese da metionina, também tenha sido afetada negativamente. Ressalta-se que a concentração de metionina diminuiu nas plantas crescidas com baixa disponibilidade de S. Segundo Migge *et al.* (2000), o aumento de O-fosfohomoserina pode atuar negativamente na etapa inicial da síntese de metionina, particularmente na fosforilação de aspartato. Assim, o aspartato não utilizado na biossíntese de metionina pode ser convertido em asparagina, o que implica em notável incremento da concentração desse aminoácido no tecido vegetal.

No caso da leguminosa estilosante que é mais rica em N do que o capim, a baixa disponibilidade de S parece ter incrementado a síntese de arginina por meio do ciclo da uréia,

onde o doador de esqueletos de C análogo ao oxaloacetato do ciclo dos ácidos tricarboxílicos é a ornitina. Possivelmente a mais elevada concentração de arginina represente o passo intermediário da formação do metabólito putrescina, o qual comumente aumenta sob condições de deficiência de S em plantas superiores (NIKIFOROVA et al., 2005).

Ao se aumentar o suprimento de S às plantas de capim e de estilosante, corrigiu-se gradualmente o desbalanço de N:S no tecido vegetal, o que resultou em aumento da produção de massa seca e melhoria do valor nutricional da forragem evidenciada pelo incremento nas concentrações de S-sulfato, S total, aminoácidos sulfurados e proteína solúvel. A concentração de S total nas folhas diagnósticas foi mais responsiva à adição de S na leguminosa, o que denota maior demanda desse nutriente do que a gramínea. A relação N:S de aproximadamente 20:1 nas folhas diagnósticas de capim-tanzânia e de estilosante coletadas no primeiro e segundo cortes foram relacionadas com a máxima produção de massa seca da parte aérea (Figura 5). Dijkshoorn e Van Wijk (1967) demonstraram que, quando a planta atinge a maturidade, a relação N:S tende a se estabilizar em 14:1 nas gramíneas e em 17:1 nas leguminosas. Monteiro et al. (1983) cultivaram siratro (*Macroptilium atropurpureum*) num solo areia quartzosa de cerrado, sob cinco doses de gesso e, observaram que as mais altas produções de massa seca, concentrações de N e massa nodular ocorreram quando essa leguminosa apresentava 1,7 g kg⁻¹ de S no tecido e relação N:S igual a 20:1. Entretanto, as plantas desenvolvidas naquele solo sem receber qualquer aplicação de S, tinham 0,7 g kg⁻¹ de S e relação N:S de 40:1. Para o trevo branco (*Trifolium repens*), Monteiro (1986) obteve valores de relação N:S da ordem de 16:1 a 18:1 para a leguminosa cultivada em Espodossolo fertilizado com S.

O equilíbrio nutricional de N e S na planta suprida adequadamente com S pode ser denotado pela diminuição de aminoácidos livres e aumento dos aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina). O aumento na concentração de aminoácidos sulfurados foi acompanhado pelo incremento na síntese de proteínas nas folhas de ambas as espécies forrageiras. Além da escassez dos aminoácidos sulfurados cisteína e metionina, o processo de proteólise prejudica grandemente a formação e acúmulo de proteínas em plantas deficientes em S (KAUR et al., 2010). Em geral, as plantas de estilosante apresentaram menores concentrações de cisteína e de metionina do que o capim-tanzânia. As baixas concentrações de aminoácidos sulfurados e reduzida responsividade dos mesmos à adição de S no estilosante possivelmente estão relacionadas à taxa de metabolismo desses aminoácidos na síntese de proteínas (CRAWFORD et al., 2000) que varia de espécie para espécie. Hirai et al. (2003),

trabalhando com plantas de *Arabidopsis*, não verificaram alterações nas concentrações de cisteína e de metionina de acordo com a nutrição das plantas em S.

As concentrações de cisteína e metionina nas plantas forrageiras são extremamente importantes e benéficas para a alimentação animal. Diferente dos animais, as plantas podem assimilar o S inorgânico como sulfato e o reduzir até sulfeto na síntese de aminoácidos contendo S (LEUSTEK et al., 2000). Por conseguinte, as plantas forrageiras constituem uma das principais fontes de aminoácidos sulfurados essenciais na dieta dos ruminantes.

Considerando o papel do S no crescimento e desenvolvimento das plantas, o incremento da concentração de cisteína é extremamente benéfico porque os resíduos desse aminoácido são muito importantes para a estabilização da conformação terciária e quaternária das proteínas por meio das pontes de dissulfeto. Além disso, os átomos de S nos grupos tióis da proteína ligados a cisteína proporcionam locais para atividades catalíticas (GILBERT, 1990). O mecanismo catalítico de biomoléculas (como glutatona, tiamina, ácido lipóico, biotina e coenzima A) baseia-se na reatividade do grupo tiol que é resultante da fraqueza da ligação C-S neste grupamento químico. A cisteína também participa da síntese de biomoléculas essenciais como antioxidantes, vitaminas e co-fatores (NOCTOR et al., 1998; DROUX, 2004; SAITO, 2004), cuja presença no organismo vegetal melhora e aumenta o desempenho produtivo das plantas.

4.5 Conclusões

A baixa disponibilidade de S ocasiona o desequilíbrio nutricional com o N nas plantas de capim-tanzânia e estilosante, evidenciado por alta relação N:S no tecido vegetal e altas concentrações de N-nitrato e aminoácidos livres. Sob limitação de S, as plantas de capim-tanzânia apresentam predomínio de asparagina na composição aminoacídica enquanto no estilosante ocorre a predominância de arginina.

O aumento da aplicação de S regula o balanceamento da relação N:S em valores próximos a 20:1, que proporciona concentrações de N e S mais apropriadas à síntese de proteínas e à produção de forragem nas plantas das duas espécies forrageiras.

Referências

AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.46, p.395-419, 1997.

BOLTON, J.; NOWAKOWSKI, T.Z.; LAZARUS, W. Sulphur-nitrogen interaction effects on the yield and composition of the protein-N, non-protein-N and soluble carbohydrates in perennial ryegrass. **Journal of the Science Food and Agriculture**, Malden, v.27, p.553-560, 1976.

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

BRUNOLD, C.; VON BALLMOOS, P.; HESSE, H.; FELL, D.; KOPRIVA, S. Interactions between sulfur, nitrogen and carbon metabolism. In: DAVIDIAN, J.-C.; GRILL, D.; DE KOK, L.J.; STULEN, I.; HAWKESFORD, M.J.; SCHNUG, E.; RENNENBERG, H. (Ed.). **Sulfur transport and assimilation in plants: regulation, interaction, signaling**. Leiden, Netherlands: Backhuys, 2003. p.45-56.

CRAWFORD, N.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. Nitrogen and sulphur. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.786-849.

COWLING, D.W.; BRISTOW, A.W. Effects of SO₂ on sulphur and nitrogen fractions on free amino acids in perennial ryegrass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 30, p.354-360, 1979.

DATKO, A.H.; MUDD, S.H.; GIOVANELLI, J.; MACNICOL, P.K. Sulfur-containing compounds in *Lemna perpusilla* 6746 grown at a range of sulfate concentrations. **Plant Physiology**, Rockville, v.62, p.629-635, 1978.

DE BONA, F.D.; FEDOSEYENKO, D.; VON WIRÉN, N.; MONTEIRO, F.A. Nitrogen utilization by sulfur-deficient barley plants depends on the nitrogen form. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.74, p. 237-244, 2011.

DIJKSHOORN, W.; VAN WIJK, S.L. The sulphur requirements of plants as evidenced by the sulphur nitrogen ratio in the organic matter: a review of published data. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.26, p.129-157, 1967.

DROUX, M. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. **Photosynthesis Research**, Wageningen, v.79, p.331-348, 2004.

DUBOUSSET, L.; ABDALLAH, M.; DESFEUX, A.S.; ETIENNE, P.; MEURIOT, F.; HAWKESFORD, M.J.; GOMBERT, J.; SÉGURA, R.; BATAILLÉ, M.P.; REZÉ, S.; BONNEFOY, J.; AMELINE, A.F.; OURRY, A.; LE DILY, F.; AVICE, J.C. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.60, p.3239-3253, 2009.

FRIEDRICH, J.W.; SCHRADER, L.E. Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.61, p.900-903, 1978.

GILBERT, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, Chichester, v.63, p.69-172, 1990.

HAQ, I.U.; CARLSON, R.M. Sulphur diagnostic criteria for French prune trees. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.16, p.911-931, 1993.

HAWKESFORD, M.J.; DE KOK, L.J. Managing sulphur metabolism in plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.29, p.382-395, 2006.

HIRAI, M.Y.; FUJIWARA, T.; AWAZUHARA, M.; KIMURA, T.; NOJI, M.; SAITO, K. Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. **Plant Journal**, Malden, v.33, p.651-663, 2003.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experimental Station, 1950. 347p. (Circular, 347)

JOHNSON, C.M.; NISHITA, H. Micro-estimation of sulphur in plant materials, soils and irrigation waters. **Analytical Chemistry**, Washington, v.24, p.736-742, 1952.

KARMOKER, J.L.; CLARKSON, D.T.; SAKER, L.R.; ROONEY, J.M.; PURVES, J.V. Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. **Planta**, New York, v.185, p.269-278, 1991.

KAUR, G.; CHANDNA, R.; PANDEY, R.; ABROL, Y.P.; IQBAL, M.; AHMAD, A. Sulfur starvation and restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. **Protoplasma**, Wien, v.248, p.299-311, 2011.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. (Ed.). **Plant biochemistry and molecular biology**. London: Wiley, 1993. p.155-180.

LEUSTEK, T.; MARTIN, M.N.; BICK, J.A. DAVIES, J.P. Pathways and regulation of sulfur revealed through molecular and genetic studies. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.141-165, 2000.

MIGGE, A.; BORK, C.; HELL, R.; BECKER, T.W. Negative regulation of nitrate reductase gene expression by glutamine and asparagine accumulating in leaves of sulfur-deprived tobacco. **Planta**, New York, v.211, p.587-595, 2000.

MILLARD, P.; SAHARP, G.S.; SCOTT, N.M. The effect of sulphur deficiency on the uptake and incorporation of nitrogen in ryegrass. **Journal of Agricultural Science**, New York, v.105, p.501-504, 1985.

MONTEIRO, F.A. **Sulfur fertilization and nutrient distribution in a Florida spodosol profile under white clover-pensacola bahiagrass**. 1986. 182 p. (PhD Dissertation) - University of Florida, Gainesville, 1986.

MONTEIRO, F.A.; MARTINS, L.; CASTRO, J.V.; LIEM, T.H. Aplicação de níveis de enxofre na forma de gesso para cultivo de leguminosas forrageiras. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 40, p.229-240, 1983.

NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Determination of total nitrogen in plant material. **Agronomy Journal**, Madison, v.65, p.109-112, 1973.

- NIKIFOROVA, V.J.; KOPKA, J.; TOLSTIKOV, V.; FIEHN, O.; HOPKINS, L.; HAWKESFORD, M.J.; HESSE, H.; HOEFGEN, R. Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.138, p.304-318, 2005.
- NIKIFOROVA, V.J.; BIELECKA, M.; GAKIÈRE, B.; KRUEGER, S.; RINDER, J.; KEMPA, S.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.-R.; HESSE, H.; HOEFGEN, R. Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants. **Amino Acids**, New York, v.30, p.173–183, 2006.
- NOCTOR, G.; ARISI, A.M.; JOUANIN, L.; KUNERT, K.J.; RENNENBERG, H.; FOYER, C.H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.623-647, 1998.
- PROSSER, I.A.; PURVES, J.V.; SAKER, L.R.; CLARKSON, D.T. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.113-121, 2001.
- PROSSER, I.M.; SCHNEIDER, A.; HAWKESFORD, M.J.; CLARKSON, D.T. Changes in nutrient composition, metabolite concentrations and enzyme activities in spinach in the early stages of S-deprivation. In: CRAM, W.J.; DE KOK, L.J.; STULEN, I.; RENNENBERG, H. (Ed.). **Sulphur metabolism in higher plants**. Leiden; Backhuys Publishers, 1997. p.339-341.
- SAS Institute Inc., **SAS OnlineDoc® 9.1.2**. Cary, NC: SAS Institute Inc. JMP Statistics and Graphics Guide, version 5. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.
- SAITO, K. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, p.2443-2450, 2004.
- SINCLAIR, A. An autoanalyzer method for determination of extractable sulphate in plant material. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.40, p.693-697, 1974.
- TABATABAI, M.A. Sulfur. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Pt 2. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 501-538.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C. Conjunto modulado em vidro para destilação a vapor de amônia pelo método Kjeldhal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.3, p.61-63, 1979.
- THOMAS, S.G.; BILSBORROW, P.E.; HOCKING, T.J.; BENNETT, J. Effect of sulphur deficiency on the grown and metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* cv Druid). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v.80, p.2057-2062, 2000.
- WRIGHT, M.J.; DAVISON, K.L. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.16, p.197-274, 1964.

5 ENXOFRE REGULA A SÍNTESE DE GLUTATIONA E A ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLUTATIONA REDUTASE E GLUTATIONA SULFO-TRANSFERASE EM PLANTAS FORRAGEIRAS

Resumo

A aplicação de enxofre (S) pode melhorar o crescimento das plantas devido à maior concentração de glutathione (GSH), que torna o sistema antioxidante mais eficiente, aumentando assim a capacidade da planta para resistir condições de estresse ambiental e aumentar a produção. As propriedades do antioxidante GSH em plantas são benéficas para ajudá-las a se adaptar às condições adversas, no entanto, os estudos ainda não avaliaram o efeito da GSH em espécies forrageiras recomendadas para pastagens tropicais. Assim, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com o objetivo de investigar os efeitos do S na produção de massa seca, nas concentrações de S total, S-sulfato e glutathione e na atividade das enzimas glutathione redutase (GR) e glutathione sulfo-transferase (GST) nas folhas recém-expandidas e raízes das plantas forrageiras tropicais *Panicum maximum* cv. Tanzânia e *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão em fase de crescimento inicial e de rebrotação. As doses de S aplicadas foram ajustadas de modo a permitir nutrição baixa, intermediária e alta em S para cada espécie, tendo sido fornecidas as doses de S: 0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L⁻¹ para o capim e 0,10; 0,70; 1,30; 1,90 e 2,50 mmol L⁻¹ para o estilante. A aplicação de S favoreceu o incremento da produção de massa seca da parte aérea e raízes e aumentou nas concentrações de S total, S-sulfato e glutathione nas folhas diagnósticas e raízes para ambas as espécies forrageiras nos dois cortes. As plantas crescidas sob limitação de S apresentaram alta atividade da enzima GR visando regenerar a GSH que atua protegendo as células contra danos oxidativos decorrentes do estresse da deficiência nutricional. O fornecimento de S aumentou a atividade da GST incrementando a capacidade do vegetal de suportar estresses ambientais.

Palavras-chave: Forrageiras tropicais; Nutrição de enxofre; *Panicum maximum* cv. Tanzânia; *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão

Abstract

Supplying sulfur (S) can improve plant growth by increasing concentrations of glutathione (GSH), which boosts the antioxidant system and thereby strengthens plants' capacity to resist environmentally stressful conditions and increase production. While properties of the antioxidant GSH benefit plants by helping them adapt to adverse conditions, studies have not yet assessed how GSH affects the forage species most commonly recommended for tropical pastureland. Two greenhouse experiments were performed to examine the effects of S on dry mass production, concentrations of total S, S-sulfate, and glutathione, and activity of the GR and GST enzymes in newly expanded leaves and roots of the tropical forage plants *Panicum maximum* cv. Tanzânia (a grass) and *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (stylo) during the establishment and regrowth phases. Sulfur was supplied at rates reflecting low, intermediate and high levels for each species: 0.10, 0.55, 1.00, 1.45, and 1.90 mmol L⁻¹ for the grass and 0.10, 0.70, 1.30, 1.90, and 2.50 mmol L⁻¹ for stylo. Adding S increased dry mass production of both the aboveground portion and the roots, and also increased concentrations of total S, S-sulfate, and glutathione in diagnostic leaves and roots of both species collected at the two harvests. Plants grown under S limitation showed high levels of GR activity, related to the regeneration of GSH, which acts to protect cells

against oxidative damage caused by the stress of nutritional deficiency. S supply increased GST activity, and consequently plants' capacity to withstand environmental stresses.

Keywords: *Panicum maximum* cv. Tanzania; *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão. Sulfur nutrition; Tropical forage plants

5.1 Introdução

O enxofre (S) tem destacada importância na produtividade e qualidade nutricional das culturas agrícolas, pois altera diretamente o metabolismo e, conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas (MCGRATH; ZHAO, 1995; ZHAO; HAWKESFORD, MCGRATH, 1999; BLAKE-KALFF et al., 2000; MURPHY et al., 2002; DE BONA; MONTEIRO, 2010). Nas plantas superiores, o S absorvido pelas raízes como sulfato inorgânico é transportado via xilema para as folhas, onde é reduzido até sulfeto. O sulfeto proveniente da redução do sulfato nos cloroplastos é a forma de S metabolicamente útil para a planta, sendo utilizado nos plastídeos, mitocôndrias e citosol para sintetizar a cisteína (KOPRIVA, 2006; RAUSCH et al., 2007; HELL; WIRTZ, 2008). A cisteína é diretamente incorporada em peptídeos e proteínas, ou serve como doador de S reduzido para a síntese da metionina, *clusters* de ferro-enxofre, coenzimas e vários metabólitos secundários, dentre os quais se destaca a glutatona (KOPRIVA, 2006; KOPRIVA; WIEDEMANN; RESKI, 2007). O sulfato inorgânico absorvido e não metabolizado pode ser armazenado nos vacúolos de células do mesófilo foliar (BLAKE-KALFF et al., 1998).

O sulfato inorgânico e o metabólito secundário glutatona são móveis no floema (RENNENBERG; SCHMITZ; BERGMAN, 1979; LAPPARTIENT; TOURAINE, 1996) e são formas importantes de reserva de S nas plantas. A glutatona, na sua forma reduzida (GSH), constitui a maior reserva não-protéica de S reduzido nas plantas, podendo desempenhar múltiplas funções no metabolismo vegetal, tais como: transporte de S reduzido, regulação da nutrição de S, co-substrato em reações enzimáticas, regulador da atividade de diversas enzimas, transportador de hormônios e poderoso agente antioxidante (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; DROUX, 2004).

A ação antioxidante da glutatona é extremamente benéfica no combate a estresses bióticos e abióticos que afetam o crescimento das plantas (NOCTOR; FOYER, 1998; GRILL; TAUSZ; DE KOK, 2001). O potencial antioxidante e de detoxificação conferido pela glutatona à célula vegetal se deve, em parte, à atividade das enzimas glutatona redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST) (NOCTOR et al., 1998). A enzima GR é responsável pela

reciclagem da GSH a partir da glutathiona oxidada (GSSG). A GSH é a forma ativa de glutathiona porque doa elétrons para os radicais livres ou moléculas com elétrons desemparelhados. Assim, por governar a concentração das formas GSH e GSSG, a atividade da GR é indicadora do estado de estresse da planta e da resistência da planta ao estresse oxidativo (NOCTOR; FOYER, 1998; NOCTOR et al., 1998; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Com modo de ação diferente da GR, a GST catalisa a conjugação da GSH com grande variedade de compostos hidrofóbicos e eletrofílicos para formar derivados peptídicos menos ou não tóxicos (SCHRÖDER, 2001).

Além do efeito no crescimento e produção das plantas, as propriedades antioxidantes da glutathiona agregam qualidade ao produto vegetal a ser consumido pelo homem ou animal. Considerando estritamente a produção de forragem para alimentação animal, constata-se que a maioria dos estudos investiga apenas a resposta produtiva das plantas à adição quantitativa dos nutrientes, dentre eles o S. Nesse contexto, há nítida demanda por pesquisas que, além dos efeitos do S na produção de plantas forrageiras, contemplem avaliações da melhoria no valor nutricional da forragem em termos de concentrações de S, S-sulfato e de glutathiona fomentado pelo fornecimento desse macronutriente. A quantidade de S requerida pelas plantas varia entre as espécies vegetais. Espécies leguminosas tendem a exigir maiores quantidades de S na adubação do que as gramíneas (GILBERT; ROBSON, 1984; TALLEC et al., 2009), sendo essa exigência também dependente do estágio de desenvolvimento das plantas forrageiras (estabelecimento ou rebrotação após o corte).

Com o presente estudo objetivou-se investigar o efeito da aplicação de S na produção de massa seca, concentrações de S total, S-sulfato e glutathiona e atividade das enzimas GR e GST nas folhas recém-expandidas e raízes das espécies forrageiras tropicais *Panicum maximum* e *Stylosanthes guianensis*, nas fases de crescimento inicial e de rebrotação.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Condições de crescimento, tratamentos e delineamento experimental

Plantas de *Panicum maximum* cv. Tanzânia (capim-tanzânia) e *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (estilosante Mineirão) foram crescidas durante o verão em casa de vegetação com temperatura média de 30 °C e fotoperíodo de 16/8 h (dia/noite), em vasos plásticos com capacidade de 3,6 L contendo quartzo moído como substrato inerte. As sementes do capim e do estilosante foram germinadas em bandejas contendo substrato inerte e tiveram fornecimento diário de água desionizada. As plântulas de ambas as espécies foram

transplantadas para os vasos plásticos aos 15 dias após a semeadura. Cinco plantas de capim ou de estilosante foram crescidas em cada vaso.

As doses de S foram diferenciadas entre as espécies e foram fornecidas na solução nutritiva preparada segundo Hoagland e Arnon (1950) para simular condições de nutrição baixa, intermediária e alta de S para as plantas. As cinco doses de S na solução nutritiva testadas para o capim-tanzânia foram de 0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L⁻¹ e para o estilosante foram de 0,10; 0,70; 1,30; 1,90 e 2,50 mmol L⁻¹. As unidades experimentais foram alocadas em blocos casualizados, com quatro repetições. A composição da solução nutritiva para os demais nutrientes continha 1 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄, 5 mmol L⁻¹ de KCl, 2 mmol L⁻¹ de KNO₃, 5 mmol L⁻¹ de Ca(NO₃)₂, 9 mmol L⁻¹ de NH₄NO₃, 46 µmol L⁻¹ de H₃BO₃, 9 µmol L⁻¹ de MnCl₂, 0,73 µmol L⁻¹ de ZnCl₂, 0,30 µmol L⁻¹ de CuCl₂, 0,11 µmol L⁻¹ de H₂MoO₄ [H₂O] e 100 µmol L⁻¹ de Fe(III)-EDTA. O S na solução nutritiva foi fornecido pelo sal MgSO₄. A concentração de magnésio (Mg²⁺) foi ajustada utilizando-se MgCl₂, de modo que, em todas as doses de S, a concentração final de Mg²⁺ fosse igual a 2 mmol L⁻¹. O crescimento das plântulas até o quinto dia após o transplantio ocorreu em solução nutritiva diluída, com concentração dos nutrientes correspondente a 25% da utilizada no experimento. Após esse período, aplicou-se a solução nutritiva definitiva, a qual foi renovada a cada 14 dias para ambas as espécies.

Durante o período experimental foram realizadas duas colheitas de plantas de cada espécie. A parte aérea do capim foi colhida aos 35 dias após o transplante (com corte 5 cm acima da junção parte aérea-raízes) e novamente aos 30 dias de rebrotação após a primeira colheita (corte rente a base da planta). Em ambos os cortes, todas as plantas foram colhidas quando as folhas maduras do capim em estado fenológico mais avançado iniciaram a processo de senescência, independente da dose de S aplicada. A parte aérea do estilosante foi colhida aos 50 dias após o transplante (corte 20 cm acima da base da planta) e aos 27 dias de rebrotação após a primeira colheita (corte rente à base da planta). O período de crescimento de 50 dias até a realização do primeiro corte foi necessário para garantir vigor de rebrotação e persistência das plantas após a desfolhação. Em ambos os cortes, a colheita ocorreu quando as plantas em estágio fenológico mais avançado atingiram 60 cm de altura, independente do suprimento de S. Essa altura é indicada para a colheita devido ao alto valor forrageiro e alta digestibilidade do material vegetal nessa idade do estilosante (QUADROS et al., 2004). Na colheita final (segundo corte) de ambas as espécies, as raízes também foram coletadas.

5.2.2 Determinações

5.2.2.1 Produção de massa seca e concentração de S total e S-sulfato no tecido vegetal

Todo material vegetal colhido foi colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até atingir massa constante, com posterior pesagem em balança de precisão para a obtenção da produção de massa seca da parte aérea e raízes das plantas. A concentração de S total nas folhas diagnósticas e nas raízes foi determinada conforme metodologia descrita por Tabatabai (1982). O extrato foi obtido via digestão nítrico-perclórica, a partir do qual foi determinado o S total pelo método da turbidimetria do cloreto de bário. A determinação do sulfato inorgânico ou livre seguiu o procedimento modificado de Sinclair (1974). A extração do S-sulfato foi realizada utilizando 1g de massa seca vegetal moída e 25 mL de solução extratora contendo ácido acético glacial, ácido clorídrico e ácido ortofosfórico, seguida de agitação por 30 min na velocidade de 200 rpm e temperatura de 25°C. Após filtragem em papel, adicionou-se ao extrato da digestão uma solução redutora contendo os ácidos iodídrico, hipofosforoso e fórmico. Essa mistura foi colocada em aparato adaptado de Johnson e Nishita (1952) e o H₂S formado foi destilado e recolhido em solução de acetato de sódio e zinco (NaOAc-Zn(OAc)₂) e quantificado por espectrofotometria a 670 nm, após a adição das soluções de N,N-dimetil-p- sulfato de fenilenodiamina [(CH₃)₂NC₆H₄NH₂.H₂SO₄] e sulfato de amônio férrico (Fe₂(SO₄)₃(NH₄)₂SO₄) para o desenvolvimento da cor azul.

5.2.2.2 Concentração de glutathiona e atividade enzimática no tecido vegetal

Amostras de folhas diagnósticas do capim-tanzânia e do estilosante foram coletadas na ocasião dos dois cortes das plantas visando a determinação da concentração de glutathiona e da atividade enzimática da GR e da GST. Amostras de raízes para essas determinações foram coletadas somente na colheita final das plantas. A massa fresca vegetal amostrada foi colocada em nitrogênio líquido e armazenada em *freezer* a -80°C até o momento das análises. As folhas diagnósticas do capim-tanzânia compreenderam as duas lâminas foliares mais jovens totalmente expandidas e, no estilosante as três folhas trifolioladas completamente expandidas contadas a partir do ápice da planta.

A glutathiona foi extraída por moagem de 1 g de material vegetal liofilizado (com almofariz, pilão e areia de quartzo) em 3 mL de solução contendo 1 g L⁻¹ de ácido sulfossalicílico, na presença de N₂ líquido. Os homogeneizados foram centrifugados a 11000 x g durante 20 min a 4°C. O extrato foi armazenado a -80°C para as determinações de glutathiona total e de suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). As concentrações de glutathiona total, de GSH e de GSSG no tecido vegetal foram determinadas por colorimetria

pelo método descrito por Anderson (1985). A concentração de GSH foi determinada utilizando 0,25 mL de extrato proteico acrescido de 1,75 mL de tampão fosfato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e 0,1 mL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico - DTNB) 3 mmol L^{-1} . Após 5 minutos de reação (em ambiente escuro), a leitura da absorbância foi efetuada em espectrofotômetro a 412 nm. Para a quantificação da glutathiona total, na mistura foram acrescidos 100 μL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e 2 μL de glutathiona redutase (Tipo III, Sigma) com concentração final na cubeta de leitura do espectrofotômetro de $0,5 \text{ unidade mL}^{-1}$, para que toda a GSSG fosse reduzida e, após 20 min de reação, realizou-se leitura da absorbância a 412 nm. A concentração de GSSG foi obtida pela subtração da GSH da glutathiona total. As formas de glutathiona GSH e GSSG foram expressas em percentual relativo à concentração de glutathiona total. A relação entre a concentração de GSH e a concentração de glutathiona total foi calculada para indicar o estado de redução da glutathiona no tecido do capim e do estilósante.

Os extratos proteicos utilizados na determinação das atividades enzimáticas foram preparados utilizando 1 g de material vegetal fresco (folhas ou raízes) congelado a -80°C . O material vegetal foi triturado em almofariz com a utilização de pistão de porcelana e adição de N_2 líquido e de polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP) na quantidade de 20% (massa/massa) da amostra. O tampão de extração utilizado foi fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,5) suplementado com 1 mmol L^{-1} de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) e 3 mmol L^{-1} de ditioneitol (DTT). Os extratos foram centrifugados a $10.000 \times g$ durante 30 min a 4°C . A concentração de proteína solúvel nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Company) como padrão. Cada amostra foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

As atividades enzimáticas foram determinadas pelo método espectrofotométrico. A atividade de GR foi determinada como descrito por Smith, Vierheller e Thorne (1988). Determinou-se a atividade da GR a 30°C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,5), 0,5 mL de DTNB 1 mmol L^{-1} e 10 μL de extrato proteico. Em seguida, foram adicionados 0,1 mL de GSSG (produto analítico) 1 mmol L^{-1} e 0,1 mL de NADPH $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm, onde a atividade da GR foi monitorada através da medição dinâmica da concentração de GSH, por meio do DTNB (indicador de cor), durante o primeiro minuto de reação. Amostras em branco (mistura de reação sem o extrato proteico) foram utilizadas como controle na análise. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o

coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mmol cm}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{mol de GSSG min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da GST foi determinada como descrito por Habig, Pabst e Jakoby (1974), com algumas modificações. A determinação foi conduzida em triplicata a 30°C em uma mistura de reação contendo $900 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 6,5), $50 \mu\text{L}$ de GSH (produto analítico) 100 mmol L^{-1} , $25 \mu\text{L}$ de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 40 mmol L^{-1} e $25 \mu\text{L}$ de extrato protéico. A mudança na absorbância devido à formação do conjugado GSH-CDNB foi medida para estimar a taxa de reação da enzima que foi avaliada a 340 nm , em espectrofotômetro, realizando-se leituras de 10 em 10 segundos, durante três minutos. Conduziu-se ensaio paralelo utilizando mistura de reação sem adição do extrato proteico (controle ou branco) para verificar a taxa de reações não-enzimáticas. O coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mmol cm}^{-1}$ (HABIG e JAKOBY, 1981) foi usado para calcular a atividade específica da enzima segundo a fórmula: Atividade específica (AE) = $(\Delta\text{Abs/min}) / (9,6 \times \text{volume da amostra em mL} \times \text{concentração de proteínas na amostra em mg mL}^{-1})$.

5.2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SAS versão 9.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004) e a análise de variância foi efetuada para cada espécie forrageira. Quando houve significância do teste F para as doses de S, realizou-se o estudo de regressões de primeiro e segundo grau e exponenciais, utilizando o comando GLM (General Linear Model). Os símbolos (*) e (**) nas equações de regressão denotam os níveis de significância ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$), respectivamente, dos coeficientes correspondentes.

5.3. Resultados

5.3.1 Produção de massa seca

O efeito positivo da aplicação do S na produção de massa seca da parte aérea do capim-tanzânia e do estilosante foi observado em ambos os cortes (primeiro e segundo) das plantas (Figuras 1A e 1B). A aplicação de $1,26 \text{ mmol L}^{-1}$ de S foi responsável pela máxima produção de massa seca da parte aérea do capim-tanzânia, independente do corte considerado. Na ocasião do primeiro corte do estilosante a produção de massa seca da parte aérea apresentou aumento linear e positivo de acordo com a disponibilidade de S (Figura 1 B). Na fase de rebrotação, a produção de massa seca da parte aérea do estilosante foi cerca de quatro vezes superior ao primeiro corte e atingiu produção máxima e constante com o suprimento de aproximadamente $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$ de S na solução nutritiva.

As máximas produções de massa seca das raízes do capim e do estilosante foram alcançadas com a disponibilidade intermediária de S de 1,00 e 1,30 mmol L⁻¹, respectivamente. Na presença de doses mais altas de S, observou-se redução da produção de massa seca radicular de ambas as espécies (Figuras 1 C e 1D).

Figura 1- Produção de massa seca da parte aérea (A, B) e das raízes (C, D) de capim-tanzânia e estilosante Mineirão em função do suprimento de doses de enxofre na solução nutritiva. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média (n=20)

5.3.2 Concentrações de S total, S-sulfato e glutatona total

As concentrações de S total, S-sulfato e glutatona total nas folhas diagnósticas e nas raízes do capim-tanzânia e do estilosante aumentaram significativamente com a aplicação de S (Figuras 2, 3 e 4). No capim-tanzânia amostrado no primeiro e segundo cortes, o fornecimento de 1,90 mmol L⁻¹ de S aumentou, em, respectivamente, 58% e 68% as concentrações de S total (Figura 2A) e 84% e 95% as concentrações de S-sulfato (Figura 3A) nas folhas recém-expandidas comparativamente às plantas cultivadas em 0,10 mmol L⁻¹ de S.

De modo geral, as concentrações de S total e de S-sulfato nas folhas diagnósticas do capim foram mais altas ao final do segundo período de crescimento das plantas.

Figura 2- Concentração de enxofre total nas folhas diagnósticas (A, B) e raízes (C, D) do capim-tanzânia e do estilante Mineirão em função do suprimento de doses de enxofre na solução nutritiva. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média (n=20)

No estilante amostrado no primeiro corte, as concentrações de S total nas folhas diagnósticas atingiram máximo valor (aproximadamente $2,5 \text{ g kg}^{-1}$) com o suprimento de aproximadamente $0,70 \text{ mmol L}^{-1}$ de S na solução nutritiva (Figura 2B). Doses de S que excederam esse limite não alteraram significativamente as concentrações de S no tecido vegetal das folhas diagnósticas do estilante no primeiro ciclo de crescimento. Por outro lado, nas folhas diagnósticas no segundo corte, as concentrações de S total responderam linear e positivamente ao suprimento de S na solução nutritiva e atingiram valores superiores a $2,0 \text{ g kg}^{-1}$. A concentração de S de reserva ou não metabolizado na forma de sulfato livre aumentou nas folhas do estilante de acordo com o incremento das doses de S aplicadas, em ambos os crescimentos da planta (Figura 3B).

Figura 3- Concentração de S-sulfato nas folhas diagnósticas (A, B) e raízes (C, D) do capim-tanzânia e do estilósante Mineirão em função do suprimento de doses de enxofre na solução nutritiva. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média (n=20)

Nas folhas diagnósticas coletadas nos dois cortes do capim-tanzânia as concentrações de glutathiona total aumentaram significativamente com a aplicação de S (Figura 4A). Observa-se que a concentração de glutathiona nas folhas diagnósticas amostradas no primeiro corte do capim foi aproximadamente duas vezes superior às das folhas coletadas no segundo. Considerando a concentração de glutathiona no tecido vegetal, constatou-se máxima concentração desse metabólito secundário de S nas raízes do capim suprido com a dose de $1,32 \text{ mmol L}^{-1}$ de S na solução nutritiva (Figura 4C). Folhas diagnósticas colhidas no primeiro corte e raízes do estilósante apresentaram aumento linear e positivo da concentração de glutathiona com o incremento das doses de S (Figuras 4B e 4C). No material coletado no segundo corte, a concentração máxima de glutathiona nas folhas do estilósante foi obtida na dose de $1,49 \text{ mmol L}^{-1}$ de S.

Figura 4- Concentração de glutathione total nas folhas diagnósticas (A, B) e raízes (C, D) do capim-tanzânia e do estilosate Mineirão em função do suprimento de doses de enxofre na solução nutritiva. As barras verticais associadas com os símbolos são o erro padrão da média (n=20)

De maneira geral, a produção de massa seca do capim e do estilosate, independente do período de crescimento, correlacionou-se positivamente com a concentração de S total e de glutathione nas folhas diagnósticas e raízes (Tabela 1). Diferentemente da concentração de S total e de glutathione, a concentração de S-sulfato nas folhas diagnósticas e raízes somente foi significativamente correlacionada com a produção de massa seca do estilosate.

A concentração de sulfato livre nas folhas e raízes do capim e do estilosate apresentou alto grau de associação positiva com a concentração de S total nessas partes das plantas (Tabela 1). Esses dois parâmetros da nutrição de S das plantas também apresentaram correlação significativa positiva com parte dos valores de concentração de glutathione total determinada nas folhas e raízes do capim e do estilosate. No caso específico do estilosate, a

concentração de glutathione total nas raízes foi altamente associada à concentração de S total e sulfato livre nesse tecido da planta.

Tabela 1- Coeficientes de correlação entre a produção de massa seca (MS) e índices nutricionais relacionados ao S no capim-tanzânia e no estilosante Mineirão crescidos sob doses de S

Índices	Capim-tanzânia			Estilosante Mineirão		
	<i>Glutathione</i>	<i>S-SO₄²⁻</i>	<i>S total</i>	<i>Glutathione</i>	<i>S-SO₄²⁻</i>	<i>S total</i>
<i>MS 1º Corte</i>	0,80*	0,56 ^{ns}	0,67*	0,74*	0,83*	0,83*
<i>MS 2º Corte</i>	0,74*	0,46 ^{ns}	0,73*	0,71*	0,53 ^{ns}	0,90*
<i>MS Raízes</i>	0,79*	0,14 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,75*	0,63*	0,74*
<i>S total 1º Corte</i>	0,86*	0,89*	-	0,48 ^{ns}	0,87*	-
<i>S total 2º Corte</i>	0,95*	0,90*	-	0,52 ^{ns}	0,79*	-
<i>S total Raízes</i>	0,61*	0,96**	-	0,99**	0,97**	-
<i>S- SO₄²⁻ 1º Corte</i>	0,91*	-	-	0,48 ^{ns}	-	-
<i>S-SO₄²⁻ 2º Corte</i>	0,86*	-	-	0,52 ^{ns}	-	-
<i>S-SO₄²⁻ Raízes</i>	0,41 ^{ns}	-	-	0,94*	-	-

** P<0,01; *P<0,05; ns- não significativo.

5.3.3 Atividade da glutathione redutase e estado de redução da glutathione

Em geral, a atividade da GR nas folhas diagnósticas e raízes foi negativamente relacionada às concentrações de S total, S-sulfato e glutathione total em ambas as espécies forrageiras, independente do período de crescimento das plantas (Tabela 2).

Tabela 2- Coeficientes de correlação entre índices nutricionais e enzimáticos relacionados ao S no capim-tanzânia e no estilosante Mineirão crescidos sob doses de S

Índices	Capim-tanzânia			Estilosante Mineirão		
	<i>Glutathione</i>	<i>S-SO₄²⁻</i>	<i>S total</i>	<i>Glutathione</i>	<i>S-SO₄²⁻</i>	<i>S total</i>
<i>GR 1º Corte</i>	-0,81*	-0,56 ^{ns}	-0,73*	-0,78*	-0,92*	-0,89*
<i>GR 2º Corte</i>	-0,73*	-0,77*	-0,89*	0,82*	-0,22 ^{ns}	0,41 ^{ns}
<i>GR Raízes</i>	-0,68*	0,16 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,89*	-0,83*	-0,89*
<i>GST 1º Corte</i>	-0,33 ^{ns}	-0,66*	-0,37 ^{ns}	0,73*	0,69*	0,66*
<i>GST 2º Corte</i>	0,99**	0,90*	0,94*	0,57 ^{ns}	0,86*	0,92*
<i>GST Raízes</i>	0,94*	0,64*	0,81*	0,78*	0,82*	0,80*

** P<0,01; *P<0,05; ns- não significativo.

De modo geral, os mais altos valores de atividade da GR nos tecidos de folhas e de raízes de capim e de estilosante foram associados às plantas crescidas sob baixa disponibilidade de S (Figura 5). Plantas de estilosante coletadas ao final do segundo

crescimento não acompanharam esse padrão de variação, verificando-se que a atividade da GR nas folhas foi mais alta mediante o fornecimento da dose intermediária de S ($1,30 \text{ mmol L}^{-1}$) (Figura 5B).

Figura 5- Atividade da glutatona redutase (GR) nas folhas diagnósticas (A, B) e raízes (C, D) do capim-tanzânia e do estilante Mineirão em função do suprimento de doses de enxofre na solução nutritiva. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média (n=20)

Similar ao observado para a atividade da GR, plantas de capim-tanzânia e estilante crescidas em $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de S apresentaram mais alto percentual de GSH (Figura 6). Nas folhas diagnósticas de ambas as espécies crescidas sob limitação de S, o percentual de glutatona na forma reduzida foi maior do que 90% nas ocasiões dos dois cortes.

Figura 6- Estado redox da glutatona indicado pelo percentual de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia e do estilosate Mineirão no primeiro (A, B) e segundo corte (C, D) e nas raízes (E, F), em função do suprimento de doses de enxofre na solução nutritiva.

5.3.4 Atividade da glutathiona sulfo-transferase

A atividade da GST nas folhas diagnósticas e raízes do capim e do estilosate apresentaram aumentos significativos com o incremento no fornecimento de S (Figura 7), excetuando-se apenas a atividade da GST determinada nas folhas amostradas no primeiro corte do capim crescido sob doses de S de 1,45 e 1,90 mmol L⁻¹, que apresentaram decréscimo nos valores de atividade dessa enzima. A atividade da GST nas raízes foi em média três vezes mais elevada do que nas folhas para ambas as espécies.

Diferentemente da enzima GR, a atividade da GST apresentou correlação positiva com as concentrações de S total, S-sulfato e glutathiona total nas folhas diagnósticas e raízes do capim e do estilosate, na maior parte das avaliações realizadas (Tabela 2).

Figura 7- Atividade da glutathiona S-transferase (GST) nas folhas diagnósticas (A, B) e raízes (C, D) do capim-tanzânia e do estilosate Mineirão em função do suprimento de doses de enxofre na solução nutritiva. As barras verticais associadas com os símbolos representam o erro padrão da média (n=20)

5.4 Discussões

De forma similar a trabalhos realizados com outras espécies de plantas forrageiras (MURPHY et al., 2002; LAVRES JR.; MONTEIRO; SCHIAVUZZO, 2008; TALLEC et al., 2008), observou-se também no presente estudo que o suprimento adequado de S foi fundamental para o aumento ou manutenção da produção de massa seca da parte aérea do capim-tanzânia e do estilosante (Figura 1). O estágio fenológico das espécies forrageiras aparentemente não afeta a resposta da planta ao S, uma vez que os incrementos na produção de massa seca da parte aérea de ambas as espécies foram verificados tanto no crescimento inicial quanto na fase de rebrotação. Resultados similares foram reportados por Lavres Jr., Monteiro e Schiavuzzo (2008) que, em trabalho com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (capim-marandu), observaram ter a adição de 80 mg L^{-1} de S incrementado a produção de massa seca em 55% e 20%, respectivamente, nas ocasiões do primeiro e segundo cortes. Trabalhando com *Trifolium repens* (trevo-branco), Tallec et al. (2008) constataram que a rebrotação após o corte foi muito mais eficiente quando houve a aplicação de S sugerindo que a assimilação e utilização do S é importante também para os processos fisiológicos envolvidos na recuperação da planta após a desfolhação.

O suprimento de S também alterou a produção de massa seca das raízes do capim e do estilosante. As modificações observadas sugerem que a disponibilidade de S promove o crescimento das raízes e pode estimular, inclusive, a formação de novas raízes primárias e/ou secundárias por meio da indução local pela presença do nutriente (LÓPEZ-BUCIO; CRUZ-RAMIREZ; HERRERA-ESTRELLA, 2003). O padrão de variação da produção de massa seca das raízes segundo modelo quadrático (Figuras 1C e 1D) permite inferir que o estado nutricional do capim e do estilosante também desempenhou papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular. Assim, as plantas que receberam baixo suprimento de enxofre ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) apresentaram sistema radicular pouco desenvolvido, o que se atribui à deficiência de S nas plantas. Por outro lado, em doses elevadas de enxofre ($1,45$ e $1,90 \text{ mmol L}^{-1}$ para o capim e $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$ para o estilosante) também se observou a não maximização da produção de massa seca do sistema radicular das plantas, o que, por sua vez, se deve à disponibilidade suficiente ou em excesso desse nutriente na solução do solo. A situação de nutriente em excesso no meio de cultivo e possíveis reservas armazenadas do nutriente no tecido vegetal podem induzir a planta a poupar energia despendida na produção de raízes (FORDE, 2002).

A análise da produção de massa seca da parte aérea do capim e do estilosante colhida na fase pós-estabelecimento das plantas demonstra que doses intermediárias de S foram suficientes para atender a demanda nutricional básica de S e maximizar a produção de forragem. Esses resultados reforçam a hipótese de que os maiores benefícios da adubação com S nas pastagens podem não estar relacionados ao incremento de produtividade, mas sim à melhoria no valor nutricional da forragem e da capacidade das plantas crescerem sob condições de estresses bióticos e abióticos por terem seu potencial antioxidante incrementado. De fato, os resultados demonstram que diferentemente da produção de massa seca, as concentrações de S total, sulfato e glutathione nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia e do estilosante, em geral, aumentaram de acordo com o incremento das doses de S na solução nutritiva (Figuras 2, 3 e 4).

A capacidade das plantas forrageiras acumularem S nos tecidos vegetais tem sido relatada por diversos trabalhos (JONES et al., 1982; SMITH; SIREGAR, 1983; DE BONA; MONTEIRO, 2010). Jones et al. (1982) avaliaram as respostas da fertilização com S no valor nutritivo da forragem e na concentração de S nas plantas em áreas com carência nesse elemento e reportaram que a aplicação anual de S de 90 kg ha⁻¹ aumentou a concentração de S no *Trifolium subterraneum* (trevo subterrâneo) de 1,3 a 2,4 g kg⁻¹ e no *Lolium multiflorum* (azevém) de 0,9 a 2,2 g kg⁻¹. Estudando a resposta do capim-marandu, à adubação com S, De Bona e Monteiro (2010) demonstraram que o incremento no suprimento de sulfato promoveu aumento linear na concentração de S total (variação de 0,6 a 1,5 g kg⁻¹) nas folhas diagnósticas da planta.

Em termos da avaliação da nutrição da planta, torna-se importante quantificar e relacionar os componentes do S total, dentre eles o sulfato livre e a glutathione, pois os mesmos estão envolvidos em funções e rotas metabólicas distintas no organismo vegetal. Nesse contexto, sabe-se que o S absorvido pelas raízes em quantidade excedente à requerida na síntese de proteínas acumula-se na planta, especialmente na forma de sulfato inorgânico (DATKO et al., 1978). Os resultados do presente experimento demonstram grande acúmulo de sulfato livre no tecido vegetal, especialmente nas raízes, do capim e do estilosante à medida em que se aumentou a dose de S (Figura 3). Embora a concentração de S-sulfato tenha se mostrado altamente correlacionada com a de S total, esse parâmetro aparentemente não foi bom indicador da produção de massa seca de ambas as espécies forrageiras (Tabela 1). Assim, pode-se supor que a aplicação de altas doses de S para o capim e o estilosante simplesmente promoveram o acúmulo de altas concentrações de S-sulfato principalmente nos vacúolos, sem que houvesse incremento correspondente na síntese de proteínas e produção de tecido vegetal.

Além da acumulação de sulfato, a concentração de S total da planta crescida sob alta disponibilidade de S pode ser incrementada pelo aumento de duas a três vezes na concentração de S orgânico (DATKO et al., 1978). Esse incremento pode ser atribuído principalmente ao aumento na concentração do metabólito secundário glutathione (GRILL; ESTERBAUER; KLOSCH, 1979), pois a concentração de cisteína nas células vegetais permanece relativamente constante e baixa (DATKO et al., 1978), o que também foi verificado nas plantas de capim-tanzânia (29 e 74 mg kg⁻¹ de cisteína, respectivamente nas plantas crescidas em 0,10 e 1,90 mmol L⁻¹ de S) e de estilosante (19 e 10 mg kg⁻¹ de cisteína, respectivamente nas plantas crescidas em 0,10 e 2,50 mmol L⁻¹ de S).

Na presença de excesso de S inorgânico (sulfato) disponível, o processo de síntese da glutathione aparentemente excede a sua degradação na planta, pois, observou-se que a concentração de S total e de sulfato livre foi correlacionada positivamente com a concentração de glutathione nas folhas diagnósticas em ambos os períodos de coleta das amostras de plantas (Tabela 1). No caso do estilosante, verificou-se grau de associação positiva da concentração total de S e do sulfato com a concentração de glutathione total apenas nas raízes. Nesse contexto, constatou-se que o estilosante (que é mais exigente em S) apresentou concentrações maiores de S total do que o capim em seus tecidos, porém as mais altas concentrações de glutathione total em resposta ao suprimento de S foram encontradas na gramínea. Tal fato possivelmente está relacionado às características intrínsecas do metabolismo do S de ambas as espécies.

A concentração de glutathione total pode ser utilizada como parâmetro para avaliar a nutrição da planta em S (Tabela 1), porém não indica *per se* o potencial de tolerância da planta aos diversos estresses que prejudicam o crescimento e desenvolvimento. Conforme destacado anteriormente, a proporção de GSH em relação à GSSG na célula vegetal reflete o potencial de defesa da planta contra estresses oxidativos, ou seja, quanto mais alta razão GSH/GSSG mais elevada a capacidade da planta de promover a detoxificação de radicais livres (NOCTOR et al., 1998). O grande potencial redutor da GSH tem sido atribuído à presença de um resíduo central de cisteína nucleofílica (Cys) (BUWALDA et al., 1988) e ao seu papel central no sistema de defesa antioxidante nas plantas, onde também atua na regeneração de outro antioxidante solúvel em água, o ascorbato, via ciclo ascorbato-glutathione (NOCTOR; FOYER, 1998; ANJUM et al., 2011). Os resultados do presente experimento demonstram que plantas de capim-tanzânia ou de estilosante Mineirão submetidas à baixa concentração de S apresentaram alta proporção de GSH em relação a GSSG no tecido vegetal (Figura 6), o que possivelmente consiste na resposta metabólica da planta ao estresse causado pela deficiência

nutricional de S. Estudos demonstram que a limitação prolongada de S causa interferência na biossíntese de clorofila, clorose, estimulação do metabolismo secundário, prejuízo aos cloroplastos, redução das taxas de transpiração e fotossíntese, redução na absorção e no transporte de nutrientes, indução prematura da senescência foliar, indução de estresse oxidativo e alteração na atividade de várias enzimas (JUSZCZUK; OSTASZEWSKA, 2011). Certamente o aumento da GSH nas células de plantas de capim e de estilosante deficientes em S ocorreu em função do aumento da atividade da enzima GR (Figura 6), cuja função principal é regenerar a forma ativa de glutathiona a partir do GSSG. A correlação negativa entre a atividade da GR e a concentração de S total no tecido de ambas as espécies forrageiras (Tabela 2) evidencia que a baixa disponibilidade de S às plantas incrementa a atividade dessa enzima no intuito de aumentar a GSH e, conseqüentemente, aumentar a resistência do vegetal aos efeitos deletérios do desequilíbrio nutricional. A ativação ou inibição de enzimas antioxidativas depende não somente da intensidade e duração do estresse, mas também do tipo de tecido e idade da planta (SGHERRI et al., 2001). No caso da limitação de S, em ambas as espécies a atividade da GR foi mais elevada nas raízes do que nas folhas diagnósticas das plantas.

Complementar à atividade da GR no metabolismo antioxidativo da célula vegetal, a enzima GST teve sua atividade aumentada com o suprimento de S às plantas de capim-tanzânia e de estilosante (Figura 7). O mecanismo de ação dessa enzima envolve o uso da GSH como doadora de tiol para a GST, que catalisa a conjugação da forma reduzida de glutathiona com produtos endógenos causadores de danos oxidativos às células vegetais, tais como: radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídeos de membranas e produtos de degradação oxidativa de DNA (BARLING et al., 1993; DIXON; DAVIS; EDWARDS, 2002). A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da GSH com grupos eletrofilicos de compostos xenobióticos, mediada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, o que facilita a excreção e diminui a toxicidade (LAM; SPARNINS; WATTENBERG, 1982). De modo geral, as concentrações de S total, glutathiona e sulfato nos tecidos vegetais (Tabela 2) se correlacionaram positivamente com a atividade da GST nas plantas de capim e de estilosante, de acordo com o fornecimento de S.

5.5 Conclusões

A produção de massa seca do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão é incrementada com o aumento no suprimento de S às plantas, que também promove elevação nas concentrações de S total, S-sulfato e glutathiona total do tecido vegetal. As plantas forrageiras

crescidas sob limitação de S apresentam alta atividade da enzima GR visando regenerar a GSH, que atua protegendo as células contra danos oxidativos decorrentes do estresse da deficiência nutricional. O fornecimento de S aumenta a atividade da GST, o que resulta em mais elevada capacidade do vegetal de suportar estresses ambientais.

Referências

- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, New York, v.113, p.548–555, 1985.
- ANJUM, N.A.; UMAR, S.; IQBAL, M.; KHAN, N.A. Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbate–glutathione cycle metabolism. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v.58, p.92–99, 2011.
- BARLING, D.; RADZIO, R.; STEINER, U.; WEILER, E.W. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal Biochemistry**, Heildeberg, v.216, p.579-586, 1993.
- BLAKE-KALFF, M.; HARRISON, K.R.; HAWKESFORD, M.J.; ZHAO, F.J.; MC GRATH, S.P. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.1337-1344, 1998.
- BLAKE-KALFF, M.; HAWKESFORD, M.J.; ZHAO, F.J.; MC GRATH, S.P. Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.22, p.95–107, 2000.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v.91, p.179-194, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-259, 1976.
- BUWALDA, F.; DE KOK, L.J.; STULEN, I.; KUIPER, P.J.C. Cysteine, glutamylcysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.7, p.663-668, 1988.
- DATKO, A.H.; MUDD, S.H.; GIOVANELLI, J.; MACNICOL, P.K. Sulfur-containing compounds in *Lemna perpusilla* 6746 grown at a range of sulfate concentrations. **Plant Physiology**, Rockville, v.62, p.629-635, 1978.
- DE BONA, F.D.; MONTEIRO, F.A. Marandu palisadegrass growth under nitrogen and sulphur for replacing Signal Grass in degraded tropical pasture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, p.570-578, 2010.
- DIXON, D.P.; DAVIS, B.G.; EDWARDS, R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. **Journal Biological Chemistry**, Rockville, v.277, p.30859-30869, 2002.

DROUX, M. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. **Photosynthesis Research**, Wageningen, v. 79, p. 331-348, 2004.

FORDE, B.G. Local and long-range signaling pathways regulating plant response to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.53, p.203-224, 2002.

GILBERT, M.A.; ROBSON, A.D. Studies on competition for sulfur between subterranean clover and annual ryegrass. III. Effects of plant density and nitrogen supply. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 35, p.75-83, 1984.

GRILL, D.; ESTERBAUER, H.; KLOSCH, U. Effect of sulphur dioxide on glutathione in leaves of plants. **Environmental Pollution**, Oxon, v.19, p.187-194, 1979.

GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L.J. **Significance of glutathione in plant adaptation to the environment**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 263 p.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.77, p.398-405, 1981.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal Biological Chemistry**, Rockville, v.249, p.7130-7139, 1974.

HELL, R.; WIRTZ, M. Metabolism of cysteine in plants and phototrophic bacteria. In: HELL, R.; DAHL, C.; KNAFF, D.; LEUSTEK, T. (Ed.). **Advances in photosynthesis and respiration sulfur metabolism in phototrophic organisms**, Dordrecht: Springer, 2008. p. 59-91.

JUSZCZUK, I.M.; OSTASZEWSKA, M. Respiratory activity, energy and redox status in sulphur-deficient bean plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.74, p.245-254, 2011.

KOPRIVA, S. Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. **Annals of Botany**, London, v.97, p.479-495, 2006.

KOPRIVA, S.; WIEDEMANN, G.; RESKI, R. Sulfate assimilation in basal land plants. What does genomic sequencing tell us? **Plant Biology**, Malden, v.9, p.556-564, 2007.

JOHNSON, C.M.; NISHITA, H. Micro-estimation of sulphur in plant materials, soils and irrigation waters. **Analytical Chemistry**, Washington, v.24, p.736-742, 1952.

JONES, M.B.; RENDING, V.V.; TORREL, D.T.; INOUE, T.S. Forage quality for sheep and chemical composition associated with sulfur fertilization on a sulfur deficient site. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p.775-780, 1982.

LAM, L.; K.T.; SPARNINS, V.L.; WATTENBERG, L.W. Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferase activity in the mouse. **Cancer Research**, Philadelphia, v.42, p.1193-1198, 1982.

LAPPARTIENT, A.G.; TOURAINE, B. Demand-driven control of root ATP sulphurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola. The role of phloem-translocated glutathione. **Plant Physiology**, Rockville, v.111, p.147–157, 1996.

LAPPARTIENT, A.G.; VIDMAR, J.J.; LEUSTEK, T.; GLASS, A.D.; TOURAINE, B. Inter organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. **Plant Journal**, Malden, v. 18, p.89-95, 1999.

LAVRES JR., J.; MONTEIRO, F.A.; SCHIAVUZZO, P.F. Concentração de enxofre, valor SPAD e produção do capim-Marandu em resposta ao enxofre. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.3, p.225-231, 2008.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.6, p.280-287, 2003.

MCGRATH, S.P.; ZHAO, F.J. A risk assessment of sulphur deficiency in cereals using soil and atmospheric deposition data. **Soil Use and Management**, Malden, v.11, p.110–114, 1995.

MURPHY, M.D.; COULTER, B.S.; NOONAN, D.G.; CONNOLLY, J. The effect of sulphur fertilisation on grass growth and animal performance. **Irish Journal of Agricultural & Food Research**, Dublin, v.41, p.1–15, 2002.

NOCTOR, G.; ARISI, A.M.; JOUANIN, L.; KUNERT, K.J.; RENNENBERG, H.; FOYER, C.H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.623-647, 1998.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.

QUADROS, D.G.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; RAMOS, A.K.B.; PAROLIN, F.J.T. Acúmulo de massa seca e dinâmica do sistema radicular do estiloso Mineirão submetido a duas intensidades de desfolhação. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.5, p.113-122, 2004.

RAUSCH, T.; GROMES, R.; LIEDSCHULTE, V.; MÜLLER, I.; BOGS, J.; GALOVIC, V.; WACHTER, A. Novel insight into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants. **Plant Biology**, Malden, v. 9, p.565-572, 2007.

RENNENBERG, H.; SCHMITZ, K.; BERGMAN, L. Long distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. **Planta**, New York, v.176, p.68-74, 1979.

SAS Institute Inc., **SAS OnlineDoc® 9.1.2**. Cary, NC: SAS Institute Inc. JMP Statistics and Graphics Guide, version 5. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.

SCHRÖDER, P. The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. In: GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L.J. (Ed.). **Significance of glutathione in plant adaptation to the environment**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.155-183.

SGHERRI, C.; MILONE, A.; CLIJTERS, H.; NAVARI, F. Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to sub-symptomatic copper concentrations. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.158, p.1439-1447, 2001.

SINCLAIR, A. An autoanalyzer method for determination of extractable sulphate in plant material. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.40, p.693-697, 1974.

SMITH, F.W.; SIREGAR, M.E. Sulfur requirements of tropical forages. In: BLAIR, G.J.; TILL, A.R. (Ed.). **Sulfur in South-East Asian and South Pacific agriculture**. Armidale: The University of New England, 1983. p.76-86.

SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5' Dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical Biochemistry**, Washington, v.175, p.408-413, 1988.

TABATABAI, M.A. Sulfur. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. pt 2. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.501-538.

TALLEC, T.; DIQUELOU, S.; FAUVEAU, C.; BATAILLÉ, M.P.; OURRY, A. Effects of nitrogen and sulfur gradients on plant competition, N and S use efficiencies and species abundance in a grassland plant mixture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.313, p.267-282, 2008.

TALLEC, T.; DIQUELOU, S.; AVICE, J.C.; LESUFFLEUR, F.; LEMAUVIEL-LAVENANT, S.; CLIQUET, J.B.; OURRY, A. Availability of N and S affect nutrient acquisition efficiencies differently by *Trifolium repens* and *Lolium perenne* when grown in monoculture or in mixture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.66, p.309-316, 2009.

ZHAO, F.J.; HAWKESFORD, M.J.; MCGRATH, S.P., Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v.30, p.1-17, 1999.

6 ENXOFRE COORDENA CRESCIMENTO, SÍNTESE DE GLUTATIONA E RESPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM CAPIM TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO

Resumo

O enxofre (S) é um elemento essencial para as plantas e desempenha papel crucial em muitos processos metabólicos. Dois experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento, com o objetivo de investigar o efeito do S no metabolismo do ciclo ascorbato-glutationa (ciclo AsA-GSH) das espécies forrageiras tropicais capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) e estilosante Mineirão (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão). As doses de S fornecidas para cada espécie foram ajustadas de modo a permitir disponibilidades baixa, intermediária e alta de S, tendo sido fornecidas as seguintes doses de S: 0,10; 1,00 e 1,45 mmol L⁻¹ para o capim e 0,10; 1,30 e 1,90 mmol L⁻¹ para o estilosante. Foram avaliados parâmetros de crescimento, produção de massa, concentrações de clorofila, peróxidos, ascorbato (AsA), desidroascorbato (DHA), glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e atividade das enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutationa, bem como foram calculados índices de crescimento. Os resultados mostraram que as disponibilidades intermediária e alta de S promoveram maior crescimento, maior produção de massa e mais alta concentração de proteínas solúveis e clorofila total nas plantas de ambas as espécies. A baixa disponibilidade de S induziu o aumento da atividade de enzimas antioxidantes que atuam na regeneração da GSH e do AsA. As plantas crescidas em baixa disponibilidade de S apresentaram aumento da concentração de glutathione e maior alocação desta nas raízes.

Palavras-chave: Antioxidantes; Atividade enzimática; Ciclo ascorbato-glutationa; Forrageiras tropicais

Abstract

Sulfur (S) is an essential element for plants and plays a key role in many metabolic processes. Two growth-chamber experiments were carried out to study the effects of S on the metabolism of the ascorbate-glutathione cycle (AsA-GSH cycle) of the tropical forage species Guinea grass (*Panicum maximum* cv. Tanzania) and stylo (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão). Sulfur supply used to the plants were adjusted to low, intermediate, and high availability for each species, and were: 0.10, 1.00, and 1.45 mmol L⁻¹ for Guinea grass and 0.10, 1.30, and 1.90 mmol L⁻¹ for stylo. The determined parameters were growth, forage production, concentrations of chlorophyll, peroxides, ascorbate (AsA), dehydroascorbate (DHA), reduced glutathione (GSH), and oxidated glutathione (GSSG), and the activity of enzymes related to the ascorbate-glutathione cycle. Growth indices were calculated. The results showed that intermediate and high S availability increased growth, forage production, and concentrations of soluble proteins and total chlorophyll in plants of both species. Low S availability increased activity of the antioxidant enzymes that act in the regeneration of GSH and AsA. Plants grown with low S availability showed higher concentration of glutathione and greater allocation of glutathione to roots.

Keywords: Ascorbate-glutathione cycle; Antioxidants; Enzymatic activities; Tropical forages

6.1 Introdução

O enxofre (S), além de ser um elemento essencial para o crescimento das plantas superiores, pode estar associado à resistência das plantas ao estresse oxidativo (NIKIFOROVA et al., 2005; KNOP et al., 2007; KRUSE et al., 2007). Nas plantas, o S é incorporado em moléculas orgânicas na forma tiólica (-SH) nas proteínas (resíduos de cisteína) ou em compostos não-protéicos como glutathiona (GSH e GSSG). A glutathiona (GSH) é a maior reserva não-protéica de S reduzido nas plantas, a qual pode regular a alocação de S entre os órgãos (HERSCHBACH; RENNENBERG, 1994, 1996; MAY et al., 1998) e atuar como poderoso agente antioxidante (DROUX, 2004; TAUSZ; SIRCELJ; GRILL, 2004; KHAN et al., 2009; SZALAI et al., 2009) extremamente benéfico no combate aos estresses bióticos e abióticos que afetam as plantas (NOCTOR; FOYER, 1998; NAZAR et al., 2011). As propriedades antioxidantes da glutathiona dependem da oxidação dos grupamentos -SH, o que origina a forma dissulfeto (GSSG). A razão entre as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) é considerada um sinalizador celular e é mantida pela glutathiona redutase (GR) (MADHAVA RAO; SRESTY, 2000).

A glutathiona pode atuar diretamente na remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MAY et al., 1998; NOCTOR; FOYER, 1998; FOYER; NOCTOR, 2005) ou por via enzimática por meio do ciclo ascorbato-glutathiona, que é o principal modo de ação da GSH no combate aos radicais livres, o qual possibilita a regeneração do ascorbato reduzido (AsA), outro antioxidante muito importante nas células das plantas, nomeadamente na detoxificação de H_2O_2 (FOYER, 1993; NOCTOR; FOYER, 1998; NOCTOR et al., 1998; POTTERS et al., 2002). A enzima GR catalisa a conversão de GSSG para GSH por meio de uma reação dependente de NADPH, assim conservando o conteúdo de GSH necessário para manter a capacidade antioxidante e de detoxificação da célula (FOYER; NOCTOR, 2001). Além da GR, existem várias enzimas que direta ou indiretamente desempenham papéis cruciais na remoção do excesso de ROS e seus produtos de reação nas plantas. As principais enzimas removedoras de ROS nas plantas incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). Juntamente com os antioxidantes ácido ascórbico (AsA) e glutathiona (GSH), essas enzimas fornecem às células mecanismos altamente eficientes para detoxificar O_2 e H_2O_2 .

O ciclo ascorbato-glutathiona envolve reações sucessivas de oxidação-redução do AsA, GSH e NADPH pelas enzimas APX, desidroascorbato redutase (DHAR), monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e GR (FOYER, 1993; FOYER; LELANDIS;

KUNERT, 1994; GRATÃO et al., 2005). A APX utiliza duas moléculas de AsA para a redução do H_2O_2 a H_2O , com formação de duas moléculas de monodesidroascorbato (MDHA). Este radical pode ser diretamente reduzido a AsA pela enzima MDHAR, utilizando o NADPH como agente redutor, ou pode sofrer dismutação espontânea e formar desidroascorbato (DHA). O DHA é reduzido a AsA pela ação da DHAR, que utiliza a GSH como substrato redutor, em reação que origina GSSG, que é novamente reduzida a GSH pelo NADPH, numa reação catalisada pela enzima GR. A disponibilidade de S para as plantas influencia a reserva de glutathione, e conseqüentemente pode provocar distúrbios no funcionamento do ciclo ascorbato-glutathione que mantém a homeostase do potencial redox celular, controlando a síntese, consumo e reciclagem de AsA e GSH (NOCTOR et al., 1998; SEMANE et al., 2007).

É aceito que o aumento do suprimento de S à planta garante melhor crescimento devido ao aumento da concentração de GSH, o que torna o sistema antioxidativo mais eficiente, incrementando a capacidade da planta para suportar condições de estresses ambientais e tornando-a mais produtiva. Embora as propriedades do antioxidante natural GSH presente nas plantas sejam potencialmente benéficas à adaptação das plantas a condições ambientais adversas, não existem estudos que tenham avaliado o efeito da GSH em plantas forrageiras tropicais, tanto gramíneas quanto leguminosas. O capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia), pertencente à família Poaceae, e o estilosante (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão), da família Fabaceae, são duas espécies forrageiras recomendadas para pastagens tropicais, podendo ser cultivadas em consórcio em variados sistemas de pastejo. A quantidade de S requerida pelas plantas varia entre as espécies vegetais. Espécies de leguminosas tendem a exigir maiores quantidades de S na adubação do que as gramíneas (GILBERT; ROBSON, 1984; BROWN et al., 2000; TALLEC et al., 2009).

Tendo em consideração as particularidades quanto à exigência nutricional destas espécies em S, objetivou-se investigar o efeito da disponibilidade do S no crescimento, no metabolismo da glutathione e na atividade das enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione das espécies forrageiras *Panicum maximum* cv. Tanzânia e *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Obtenção de plantas e condições de crescimento

As sementes de capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) e de estilosante (*Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão) foram germinadas em bandejas contendo substrato

inerte e fornecimento diário de água desionizada. Quinze dias após a semeadura as plântulas foram transferidas para caixas de plástico contendo substrato inerte, consistindo numa mistura de perlite e vermiculite, na proporção 1:1, e cinco litros de solução nutritiva com a seguinte composição: 1 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 5 mmol L⁻¹ KCl, 2mmol L⁻¹ KNO₃, 5 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 9 mmol L⁻¹ NH₄NO₃, 46 µmol L⁻¹ H₃BO₃, 9 µmol L⁻¹ MnCl₂, 0,73 µmol L⁻¹ ZnCl₂, 0,30 µmol L⁻¹ CuCl₂, 0,11 µmol L⁻¹ H₂MoO₄ [H₂O] e 100 µmol L⁻¹ Fe(III)-EDTA. O S foi fornecido como MgSO₄, portanto, o fornecimento de magnésio (Mg²⁺) foi ajustado complementarmente com MgCl₂ de modo que a concentração final de Mg²⁺ fornecida em todos os tratamentos de S foi 2 mmol L⁻¹.

As doses de S foram diferenciadas para as duas espécies, em virtude dos requerimentos nutricionais serem mais elevados para as leguminosas. A escolha das doses de S aplicadas para cada espécie foi ajustada de modo a permitir disponibilidades baixa, intermediária e alta de S. Deste modo, foram fornecidas as doses de S de 0,10; 1,00 e 1,45 mmol L⁻¹ para o capim-tanzânia e 0,10; 1,30 e 1,90 mmol L⁻¹ para o estilosante.

As plântulas foram crescidas em solução nutritiva diluída com concentração correspondente a 25% da solução completa até o terceiro dia depois do transplântio, após o que se substituiu pela solução nutritiva completa e definitiva. As plantas de ambas as espécies foram crescidas por 28 dias em solução nutritiva completa e tiveram as soluções nutritivas renovadas a cada 14 dias.

As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com condições controladas de temperatura para 25 ± 1°C, sob intensidade luminosa de 230 µmol quanta m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas de escuro. As unidades experimentais para cada espécie foram distribuídas em blocos casualizados com quatro repetições. Cada unidade experimental continha 20 plantas que foram colhidas aos 14 e 28 dias após o transplante.

6.2.2 Coleta de plantas e medições de crescimento e produção

As coletas de material vegetal e avaliações do crescimento das plantas foram realizadas a cada sete dias para o capim-tanzânia e a cada 14 dias para o estilosante. Os parâmetros de crescimento avaliados foram produção de massa fresca da parte aérea e raízes, altura de plantas e comprimento da raiz principal. Em ambas as espécies, a cada coleta foi realizada a separação da parte aérea e raízes das plantas que foram lavadas em água deionizada, congeladas em N₂ líquido e armazenadas em *freezer* a -80°C.

A coleta final das plantas foi realizada aos 28 dias de tratamento com S. Nessa data foi realizada a determinação da área foliar das plantas utilizando um aparelho modelo LI 3100

(LICOR, EUA). Também foram retiradas amostras das folhas diagnósticas (as duas folhas mais recentemente expandidas) de ambas as espécies visando a determinação do conteúdo de clorofila. Todo o material vegetal colhido foi colocado para secar em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até atingir massa constante, com posterior pesagem em balança de precisão para a obtenção dos resultados de produção de massa seca da parte aérea e das raízes das plantas.

A análise de crescimento das plantas foi efetuada por meio dos seguintes índices de crescimento: área foliar específica - AFE (razão entre a área foliar e a massa seca das folhas); razão de massa foliar - RMF (a razão entre a massa de matéria seca retida nas folhas e a massa de matéria seca acumulada em toda a planta); razão de massa radicular - RMR (razão entre a massa da matéria seca radicular e a massa de matéria seca acumulada em toda a planta) e relação parte aérea/raízes (razão entre a massa seca na parte aérea e a massa seca nas raízes).

6.2.3 Extração e determinação de clorofilas

A extração de clorofilas foi realizada utilizando quatro discos de folhas (área total 113,2 mm²) e 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), pré-aquecido a 65°C por uma hora, de acordo com o método descrito por Hixcox e Israelstam (1978). A densidade óptica (DO) das colorações foi medida em espectrofotômetro VIS UV em comprimentos de onda específicos (645 e 663 nm) para estimar as concentrações de clorofila a (Chl a) e clorofila b (Chl b). A concentração de clorofila total (Chl total) foi estimada pela soma das clorofilas a e b. A concentração de clorofila nos extratos foi calculada usando as equações descritas por Porra, Thompson e Kriedmann (1989):

$$\text{Chl a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12,00 \times A_{663} - 3,11 \times A_{645}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20,78 \times A_{645} - 4,88 \times A_{663}$$

$$\text{Chl total } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 17,67 \times A_{645} + 7,12 \times A_{663}$$

Estes resultados foram convertidos em microgramas de clorofila por centímetro quadrado de área foliar (RICHARDSON; DUIGAN; BERLYN, 2002).

6.2.4 Extração e determinação de glutathiona, ascorbato e H₂O₂

As amostras de folhas e raízes (0,5 g) de ambas as espécies foram homogeneizadas em 5 mL de ácido metafosfórico a 60 ml L⁻¹ (pH 2,8), contendo 1 mmol L⁻¹ de EDTA, na presença de N₂ líquido. Os homogeneizados foram centrifugados a 27000 x g durante 15 minutos a 4°C. O extrato ácido foi armazenado a -80°C para as determinações de glutathiona, ascorbato e H₂O₂.

As formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) de glutatona foram analisadas colorimetricamente pelo método descrito por Anderson, Chevone e Hess (1992). A relação entre a concentração de GSH (forma reduzida) e a concentração total de glutatona $GSH/(GSH+GSSG)$ foi definida para indicar o estado de redução da glutatona.

Os ácidos ascórbico (AsA) e o desidroascórbico (DHA) foram determinados utilizando o método adaptado de Okamura (1980). Para determinar o ascorbato total e o AsA, 125 μL do extrato ácido foram neutralizados com 25 μL de trietanolamina $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, após o que se adicionaram 150 mL de tampão fosfato de sódio 150 mmol L^{-1} (pH 7,4). Para a quantificação do ascorbato total foram adicionados 75 mL de ditione (DTT) 10 mmol L^{-1} , seguido por 15 minutos de incubação a 25°C para reduzir todo o ascorbato oxidado (DHA) presente no extrato. Para remover o excesso de DTT foram adicionados 75 μL de N-etilmaleimida a 5 g L^{-1} . As amostras foram misturadas e incubadas por 30 segundos a 25°C . Para a quantificação do AsA foi adicionada água de modo que os volumes finais das amostras de ascorbato total e AsA foram idênticos. Em ambas as amostras foram adicionados sucessivamente: 300 μL de ácido tricloroacético a 100 g L^{-1} , 300 μL de ácido fosfórico a 440 mL L^{-1} , 300 μL de 2,2'-dipiridil a 40 g L^{-1} em etanol 70% e 150 μL de FeCl_3 a 3 g L^{-1} . As amostras foram incubadas por uma hora a 37°C . A absorbância foi registrada a 525 nm. A concentração de DHA foi calculada pela diferença entre as concentrações de ascorbato total e AsA. A curva padrão de AsA, na faixa de $0\text{-}60 \mu\text{mol L}^{-1}$, foi preparada em 50 mL L^{-1} de ácido metafosfórico. A relação entre a concentração de AsA (forma reduzida) e a concentração total de ascorbato, $AsA/(AsA+DHA)$ foi definida para indicar o estado de redução do ascorbato.

A produção de H_2O_2 foi determinada segundo o método descrito por Jiang, Woollard e Wolff (1990), usando o peróxido gerado pela oxidação do Fe^{2+} , proveniente da reação de Fe^{3+} com xilenol laranja. Para a determinação de H_2O_2 , uma alíquota de 500 μL de material extraído de folhas e raízes foi adicionada a 500 μL da mistura de reação, contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de amônio ferroso, 50 mmol L^{-1} de ácido sulfúrico, 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de xilenol laranja e 200 mmol L^{-1} de sorbitol. Após 45 minutos à temperatura ambiente foram avaliadas as mudanças da absorbância a 560 nm.

6.2.5 Extração protéica e quantificação de atividades enzimáticas

Os extratos protéicos utilizados na determinação das atividades enzimáticas foram preparados a 4°C utilizando 0,5 g de material vegetal fresco (folhas e raízes) congelado em *freezer* a -80°C . O material vegetal foi triturado em almofariz de porcelana com N_2 líquido e adição de polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP) na quantidade correspondente a 50%

(m/m) da massa da amostra. O tampão de extração utilizado foi fosfato de potássio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) suplementado com 1 mmol L^{-1} EDTA, 1 mmol L^{-1} DTT, 10 mmol L^{-1} MgCl_2 e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). Os extratos foram centrifugados a $27000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram dessalinizados em colunas PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido).

A concentração de proteína solúvel nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Company) como padrão. Cada amostra foi quantificada num extrato simples lido em triplicata. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas pelo método espectrofotométrico. Uma unidade foi definida como o consumo de um micromol de substrato por minuto (μmol de substrato mg^{-1} proteína min^{-1}).

A atividade da APX (EC 1.11.1.11) foi determinada a 25°C utilizando o método de Hossain e Asada (1984), com base na diminuição do valor da absorbância a 290 nm devido à oxidação do AsA pelo H_2O_2 (ϵ_{290}) = $2,8 \text{ mmol cm}^{-1}$. A mistura de reação de 1 mL continha 50 mmol L^{-1} de fosfato de potássio-KOH (pH 7,5), $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ AsA, $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ EDTA e amostra da enzima ($14 \mu\text{g}$ proteína). A taxa de oxidação do AsA foi estimada entre 1 e 60 segundos após o início da reação adicionando $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 . A GR (EC 1.6.4.2) foi determinada pela diminuição do valor da absorbância a 340 nm devido a oxidação de NADPH (ϵ_{340}) = $6,22 \text{ mmol cm}^{-1}$, como descrito por Schaedle e Bassham (1977), numa mistura de reação de 1 mL contendo 50 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 7,5), $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ NADPH, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ GSSG, 3 mmol L^{-1} MgCl_2 e amostra da enzima ($35 \mu\text{g}$ proteína).

A SOD (EC 1.15.1.1) foi analisada pelo método “Fe-citocromo c” usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido (MCCORD; FRIDOVICH, 1969) numa mistura de reação de 1 mL contendo 50 mmol L^{-1} fosfato de potássio-KOH (pH 7,6), $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ EDTA; $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ citocromo c; $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ xantina; $0,03$ unidades de xantina oxidase e amostra da enzima ($14 \mu\text{g}$ proteína). A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi diretamente determinada pela decomposição de H_2O_2 a 240 nm em uma mistura de 1 mL contendo 50 mmol L^{-1} de fosfato de potássio-KOH (pH 7,0), 10 mmol L^{-1} H_2O_2 e amostra da enzima ($35 \mu\text{g}$ proteína).

A MDHAR (EC 1.6.5.4) foi determinada pela diminuição do valor da absorbância a 340 nm devido a oxidação do NADH (ϵ_{340}) = $6,22 \text{ mmol cm}^{-1}$, como descrito por Arrigoni et al. (1981), numa mistura de reação de 1 mL contendo 50 mmol L^{-1} de Tris-HCl (pH 7,5), $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ NADH, $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ AsA, 2 unidades de ascorbato oxidase de *Cucurbita* sp. (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) e amostra da enzima ($14 \mu\text{g}$ proteína). O

monodesidroascorbato (MDHA) foi gerado pelo sistema ascorbato/ascorbato oxidase (ARRIGONI; DIPIERRO; BORRACCINO, 1981). Para determinar a atividade da MDHAR, a taxa de oxidação do MDHA- não dependente de NADH (sem AsA e ascorbato oxidase) foi subtraída da taxa de oxidação inicial MDHA dependente de NADH (com AA e ascorbato oxidase).

A DHAR (EC 1.8.5.1) foi determinada de acordo com o método de Dalton et al. (1993), por meio do aumento do valor da absorbância a 265nm devido a formação de ascorbato (ϵ_{265}) = 14 mmol cm⁻¹. O ensaio continha 1 mL da mistura de reação com 0,1 mol L⁻¹ de tampão Hepes-KOH (pH 7,0), 2,5 mmol L⁻¹ de GSH, 0,5 mmol L⁻¹ de DHA, 0,1 mmol L⁻¹ de EDTA e amostra da enzima (35µg proteína). A taxa de reação foi corrigida para a redução não-enzimática do DHA pela GSH. O fator de 0,98 foi utilizado para corrigir a pequena contribuição da GSSG.

6.2.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância, comparando separadamente as doses de S a cada colheita (dias de tratamento com S) para cada espécie. Valores significativos foram discriminados pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, utilizando o programa estatístico SPSS versão 12 (PÉREZ, 2005). Todos os resultados apresentados são médias de n repetições (n= 3-12) com erro padrão ($\pm$ SE). As determinações de atividades enzimáticas e de concentração de metabólitos de cada réplica biológica foram efetuadas em triplicata.

6.3. Resultados

6.3.1 Crescimento das plantas

As disponibilidades intermediária e alta de S favoreceram o crescimento do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão. A massa fresca e o comprimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas desenvolvidas nestas condições foram significativamente superiores às das plantas crescidas em baixa disponibilidade de S (Figura 1). Após 28 dias de crescimento em baixa disponibilidade de S, a massa fresca na parte aérea do capim (-36%) e do estilosante (-20%) foi menos afetada do que as raízes (-55% e -45%, respectivamente) quando comparadas com plantas de ambas as espécies crescidas em disponibilidade intermediária de S (Figuras 1A, 1C).

Figura 1- Massa fresca e comprimento da parte aérea e raízes do capim-tanzânia (A, B) e do estilosante Mineirão (C, D) crescidos por 28 dias em disponibilidades diferenciadas de S. As barras são médias $\pm$ SE. As letras diferentes denotam as diferenças entre os tratamentos de S em cada data avaliada, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=4)

No momento da colheita final foram calculados os índices de crescimento das plantas (Tabela 1). As alterações no desenvolvimento das folhas do capim e do estilosante crescidos em baixa disponibilidade de S resultaram em redução significativa da área foliar em ambas as espécies (Tabela 1). A área foliar específica (AFE) apresentou valores mais expressivos nas plantas de capim crescidas em disponibilidade intermediária de S e nas plantas de estilosante crescidas em baixa disponibilidade de S. A razão da massa foliar (RMF) não foi significativamente alterada pelas disponibilidades de S em qualquer das espécies. A razão da massa radicular (RMR) do capim crescido em intermediária e alta disponibilidade de S foi maior do que em plantas crescidas em baixa disponibilidade de S.

No estilosante, a RMR foi maior em plantas crescidas em baixa disponibilidade de S do que em plantas crescidas em intermediária e alta disponibilidade de S. A limitação

nutricional de S aumentou a razão entre a massa seca da parte aérea e raízes no capim, enquanto que no estilosante, a baixa disponibilidade de S proporcionou a diminuição da razão parte aérea/raízes (Tabela 1).

Tabela 1- Razões de crescimento e área foliar do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão na colheita final (28 dias de crescimento)

Razões de crescimento	Capim-tanzânia			Estilosante Mineirão		
	0,10 S	1,00 S	1,45 S	0,10 S	1,30 S	1,90 S
Área foliar (cm ²)	141,8±8,5b	194,4±5,5a	201,6±9,2a	26,5± 2,5b	31,9±2,4a	31,2±2,4a
Área foliar específica (g cm ⁻²)	1432± 94b	1717± 48a	1458±108b	1440±129a	1089±73b	992±77b
Massa seca total (g)	0,107± 0,009c	0,137± 0,011b	0,164± 0,009a	0,019± 0,001b	0,029± 0,003a	0,031± 0,004a
Razão massa foliar (g g ⁻¹)	0,853±0,004a	0,826±0,012a	0,843±0,006a	0,946±0,022a	0,932± 0,022a	0,946±0,004a
Razão massa radicular (g g ⁻¹)	0,146±0,004b	0,175±0,010a	0,158±0,007b	0,058±0,002a	0,050± 0,002b	0,054±0,004ab
Razão parte aérea: raízes (g g ⁻¹)	5,43± 0,35a	4,70± 0,07b	5,33± 0,14a	16,35± 0,60b	20,90± 2,55a	18,06± 1,37ab

Resultados são médias ±SE, de quatro repetições. Os valores médios de cada variável seguida por letras diferentes na linha e para cada espécie são significativamente diferentes de acordo como teste de Tukey (P<0,05).

6.3.2 Proteína solúvel e pigmentos cloroplásticos

A concentração de proteínas solúveis nas folhas e raízes do capim crescido em alta disponibilidade de S foi, respectivamente, duas e cinco vezes maior do que no capim crescido em baixa disponibilidade de S (Figura 2A). No estilosante, a concentração de proteínas solúveis nas folhas e raízes crescidas em alta disponibilidade de S foi somente 1,2 e 1,8 vezes maior em relação às plantas crescidas em baixa disponibilidade de S (Figura 2B).

Nas folhas diagnósticas das plantas de capim e de estilosante cultivadas em baixa disponibilidade de S, as concentrações de clorofila a, clorofila b e clorofila total foram significativamente menores do que em plantas crescidas em disponibilidade intermediária e alta de S (Figuras 2C, 2D). No entanto, a relação clorofila a/b não foi alterada pela disponibilidade de S.

Figura 2- Concentração de proteínas solúveis nas folhas e raízes do capim (A) e do estiloso (B) e concentração de clorofila total (Chl total), clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), e razão Chl a/Chl b nas folhas diagnósticas do capim (C) e do estiloso (D) aos 28 dias de crescimento em disponibilidades de S. As barras representam as médias $\pm$ SE. As letras diferentes denotam as diferenças significativas entre os tratamentos de S, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; ($n = 4$)

6.3.3 Concentrações de peróxidos, ascorbato e glutatona

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um importante tipo de espécie reativa de oxigênio (ROS). A concentração de H_2O_2 nas folhas e raízes do capim-tanzânia aumentou progressivamente com o tempo até ao final do experimento (Figuras 3A e 3B). Ao final de 28 dias, as plantas crescidas em baixa e intermediária disponibilidades de S apresentaram maior concentração de H_2O_2 comparativamente à disponibilidade alta de S. No estiloso com 14 dias de crescimento a concentração de H_2O_2 foi mais elevada nas folhas e raízes das plantas crescidas em disponibilidade alta de S (Figura 3C). Aos 28 dias de crescimento, a concentração de H_2O_2 nas folhas e raízes não foi diferenciada pela disponibilidade de S.

Figura 3- Concentração de peróxidos (H_2O_2) nas folhas e raízes do capim-tanzânia (A e B) e do estiloso Mineirão (C) crescidos por 28 dias em disponibilidades de S. As barras representam as médias $\pm$ SE. As letras diferentes denotam as diferenças entre os tratamentos de S em cada data avaliada de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=12)

O efeito da disponibilidade de S na concentração total de ascorbato e no seu estado redox no capim variaram conforme o estágio de crescimento das plantas (Figuras 4A e 4B e Tabela 2). Plantas crescidas por sete dias em baixa disponibilidade de S apresentaram

aumento significativo na concentração de ascorbato total devido principalmente à elevada acumulação da forma oxidada (DHA). Aos 14 dias de crescimento, nas folhas de capim crescido em baixa e intermediária disponibilidades de S ocorreu aumento da concentração de ascorbato total devido ao aumento de DHA. Nas raízes do capim, a concentração de ascorbato foi mais elevada nas plantas crescidas em alta disponibilidade de S e houve predominância da forma reduzida (AsA). Aos 21 dias de crescimento, a concentração de ascorbato total nas folhas e raízes do capim não foi afetada pela disponibilidade de S. Aos 28 dias de crescimento, a disponibilidade alta de S aumentou a concentração de ascorbato total nas folhas e raízes do capim, principalmente devido ao aumento de AsA. Nas folhas do capim crescido em baixa disponibilidade de S a concentração de ascorbato também foi elevada, com predominância de AsA. Esse acréscimo nas concentrações de ascorbato total e AsA foi acompanhado por elevada atividade da GR e DHAR (Figuras 8A, 8B e 8D).

No estilosante, a disponibilidade alta de S resultou em aumento da concentração total de ascorbato e da sua forma reduzida (AsA) nas folhas tanto aos 14 quanto aos 28 dias de crescimento (Figura 4C e Tabela 2). A concentração de ascorbato total nas raízes, aos 14 dias de crescimento, não foi alterada pela disponibilidade de S. No entanto, aos 28 dias de crescimento, a concentração de ascorbato total foi maior nas raízes de plantas crescidas em baixa disponibilidade de S quando comparada às demais disponibilidades de S. A mais elevada concentração de ascorbato total nessas raízes ocorreu devido ao aumento na concentração de DHA nas plantas sob carência de S.

O suprimento de intermediária e alta disponibilidades de S no capim aumentou as concentrações de glutathiona total e da sua forma reduzida (GSH) nas folhas aos 7, 21 e 28 dias de crescimento e nas raízes aos 7 dias. Nas folhas, aos 14 dias, e nas raízes, aos 14, 21 e 28 dias de crescimento do capim, as concentrações de glutathiona total e da GSH foram mais expressivas em plantas crescidas em baixa disponibilidade de S (Figuras 5A e 5B e Tabela 2). O estilosante apresentou concentrações de glutathiona total e de GSH mais elevadas nas folhas de plantas crescidas em disponibilidades intermediária e alta de S somente aos 14 dias de crescimento. Nas raízes de estilosante, aos 14 e 28 dias, e nas folhas, aos 28 dias de crescimento, a concentração de glutathiona total e GSH foi mais elevada em plantas crescidas em baixa disponibilidade de S (Figura 5C). Nas plantas de capim e estilosante crescidas em condição de carência de S (baixa disponibilidade), o aumento na concentração de glutathiona total e GSH nas raízes e folhas foi acompanhado de mais alta atividade da GR (Figuras 8A, 8B e 9A).

Figura 4- Concentração de ascorbato reduzido (AsA), ascorbato oxidado (DHA) nas folhas (A) e raízes (B) de capim-tanzânia e estilosante Mineirão (C) crescidos por 28 dias em disponibilidades de S. As barras representam as médias das concentrações de AsA e DHA $\pm$ SE. As letras denotam as diferenças entre a concentração total de ascorbato (AsA+DHA) dos tratamentos de S em cada data avaliada. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=12)

Figura 5- Concentração de glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG) nas folhas (A) e raízes (B) de capim-tanzânia e estilosante Mineirão (C) crescidos por 28 dias em disponibilidades de S. As barras representam as médias das concentrações de GSH e GSSG $\pm$ SE. As letras denotam as diferenças entre a concentração total de glutathione (GSSG+GSH) dos tratamentos de S em cada data avaliada. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; $n = 12$

Tabela 2- Razões GSH/Total e AsA/Total nas folhas e raízes de plantas de capim-tanzânia e estilosante Mineirão crescidas sob disponibilidades de S por 28 dias

Capim-tanzânia						
Razões	GSH/Total			AsA/Total		
Folhas	0,10 S	1,00 S	1,45 S	0,10 S	1,00 S	1,45 S
7	0,88a	0,87a	0,88a	0,06b	0,24a	0,29a
14	0,86a	0,80b	0,85a	0,38b	0,41b	0,65a
21	0,81a	0,84a	0,84a	0,72a	0,75a	0,57b
28	0,80b	0,87a	0,84ab	0,70a	0,32b	0,62a
Raízes						
7	0,83a	0,84a	0,87a	0,05b	0,30a	0,41a
14	0,85a	0,88a	0,77b	0,54b	0,52b	0,62a
21	0,85a	0,83a	0,72b	0,52a	0,44b	0,40b
28	0,87a	0,76b	0,84a	0,20b	0,19b	0,69a
Estilosante Mineirão						
Razões	GSH/Total			AsA/Total		
Folhas	0,10 S	1,30 S	1,90 S	0,10	1,30	1,90
14	0,81a	0,73b	0,73b	0,62a	0,63a	0,60a
28	0,76b	0,81a	0,82a	0,71a	0,62b	0,63b
Raízes						
14	0,81a	0,79a	0,80a	0,75a	0,62b	0,70a
28	0,77a	0,75a	0,68b	0,14c	0,44b	0,61a

Resultados são médias de quatro repetições. Os valores médios de cada variável seguida por letras diferentes na linha e para cada espécie são significativamente diferentes de acordo como teste de Tukey ($P < 0,05$).

6.3.4 Atividade das enzimas anti-oxidantes SOD, CAT e APX

Nas raízes do capim crescidas por 7 dias em baixa disponibilidade de S a SOD apresentou 98% mais atividade do que em plantas crescidas em intermediária e alta disponibilidades de S (Figuras 6A e 6B). No estilosante, aos 28 dias de crescimento, a SOD teve mais atividade nas folhas e raízes de plantas crescidas em baixa disponibilidade de S. Aos 14 dias, a atividade foi maior nas folhas e raízes de plantas melhor nutridas em S, nas doses de 1,30 e 1,90 mmol L⁻¹ (Figura 7A).

Aos 14 dias de crescimento do capim, a atividade da CAT aumentou 72% nas raízes das plantas crescidas em baixa disponibilidade de S quando comparadas às demais disponibilidades de S. Nas folhas do capim, aos 14 dias, ocorreu aumento da atividade da CAT em plantas crescidas em baixa e alta disponibilidade de S. No entanto, aos 21 e 28 dias, a atividade da CAT nas plantas do capim crescidas em alta disponibilidade de S decresceu, mantendo-se semelhante à atividade de plantas crescidas em disponibilidade intermediária de S. Nas plantas crescidas em baixa disponibilidade de S, a atividade da CAT manteve-se mais elevada até os 28 dias (Figuras 6C e 6D).

Figura 6- Atividade das enzimas SOD, CAT e APX nas folhas (A, C, E) e raízes (B, D, F) de capim-tanzânia crescido por 28 dias em disponibilidades de S. As letras denotam as diferenças entre os tratamentos de S em cada data avaliada. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=12)

A CAT nas folhas do estilosante apresentou maior atividade em plantas crescidas em alta disponibilidade de S, tanto aos 14 quanto aos 28 dias de crescimento. Nas raízes do estilosante, aos 14 dias, a CAT apresentou maior atividade em baixa disponibilidade de S,

enquanto que, aos 28 dias, a maior atividade foi observada em plantas crescidas em alta disponibilidade de S (Figura 7B).

Figura 7- Atividade das enzimas CAT, SOD e APX nas folhas e raízes de estilosante (A, B, C) crescido por 28 dias em disponibilidades de S. As letras denotam as diferenças entre os tratamentos de S em cada data avaliada. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=12)

A atividade da APX nas folhas do capim aumentou com o tempo de crescimento das plantas em todas as disponibilidades de S. Todavia, aos 28 dias de crescimento, a atividade da APX foi maior nas folhas de plantas crescidas em baixa disponibilidade de S, quando comparadas à intermediária e alta disponibilidades de S (Figura 6A). A atividade da APX nas

raízes do capim crescido em baixa disponibilidade de S foi 58 e 69% superior às atividades dessa enzima em raízes de plantas crescidas em disponibilidades intermediária e alta de S, aos 14 e 28 dias de crescimento, respectivamente (Figura 6C). Nas plantas de estilosante, o aumento na disponibilidade de S refletiu-se em maior atividade da APX nas folhas aos 14 dias, enquanto nas raízes a atividade não foi afetada. Aos 28 dias, a APX apresentou maior atividade nas folhas do estilosante crescido em baixa e intermediária disponibilidades de S e nas raízes do estilosante crescido em intermediária e alta disponibilidades de S (Figura 7C).

6.3.5 Atividade das enzimas chaves do ciclo ascorbato-glutationa GR, DHAR e MDHAR

A atividade da GR foi mais elevada tanto nas folhas quanto nas raízes de plantas de capim-tanzânia crescidas em baixa disponibilidade de S, quando comparada com a atividade em plantas crescidas em intermediária e alta disponibilidades de S (Figuras 8C e 8D). No estilosante, a atividade da GR nas folhas e raízes variou conforme a disponibilidade de S. Aos 14 dias de crescimento, a GR apresentou maior atividade nas folhas das plantas crescidas em baixa disponibilidade de S. No entanto, aos 28 dias, a atividade foi mais alta em folhas de plantas crescidas em alta disponibilidade de S e nas raízes de plantas crescidas em baixa e intermediária disponibilidades de S (Figura 9A). O aumento da atividade da GR nas folhas e raízes do estilosante foi sempre acompanhado de acréscimo na concentração de GSH e aumento da razão GSH/Glutationa total, que serve como indicativo do estado oxidativo das plantas (Figura 9A e Tabela 2).

As plantas de capim-tanzânia crescidas em baixa disponibilidade de S apresentaram elevada atividade da DHAR nas raízes, aos 14 dias de crescimento, e nas folhas aos 28 dias de crescimento (Figuras 8C e 8D). A MDHAR teve maior atividade nas folhas e raízes do capim, aos 14 dias de crescimento. Nas folhas, a atividade da MDHAR foi mais intensa em plantas crescidas em baixa disponibilidade de S, enquanto que nas raízes a MDHAR apresentou acréscimo da atividade para as três disponibilidades de S (Figuras 8E e 8F). A MDHAR e a DHAR nas folhas do estilosante tiveram maior atividade aos 28 dias de crescimento, nas plantas crescidas em alta disponibilidade de S (Figuras 9B e 9C). Nas raízes do estilosante, a DHAR apresentou maior atividade nas plantas crescidas em baixa disponibilidade de S, tanto aos 14 quanto aos 28 dias de crescimento, enquanto a MDHAR teve maior atividade nas raízes do estilosante crescido em intermediária e alta disponibilidades de S.

Figura 8- Atividade das enzimas GR, DHAR e MDHAR nas folhas (A, C, E) e raízes (B, D, F) de capim-tanzânia crescido por 28 dias em disponibilidades de S. As letras denotam as diferenças entre os tratamentos de S em cada data avaliada. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=12)

Figura 9- Atividade das enzimas GR, MDHAR e DHAR nas folhas e raízes de estilosante (A, B, C) crescido por 28 dias em disponibilidades de S. As letras denotam as diferenças entre os tratamentos de S em cada data avaliada. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias, de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=12)

6.3.6 Correlações entre índices fisiológicos do capim-tanzânia e do estilosante Mineirão crescidos sob disponibilidades de S

No capim-tanzânia, a produção de massa seca da parte aérea foi positivamente correlacionada com a concentração de clorofila total nas folhas diagnósticas. A produção de massa seca na parte aérea e a concentração de clorofila foram correlacionadas negativamente com a concentração de H_2O_2 nas folhas e positivamente correlacionadas com a razão GSH/Glutationa total (Tabela 3). A concentração de H_2O_2 e a razão AsA/Ascorbato total foram negativamente correlacionadas com a razão GSH/Glutationa total. A produção de massa seca das raízes do capim e o concentração de H_2O_2 nas raízes foram negativamente correlacionadas com a razão GSH/Glutationa total, assim como a concentração de H_2O_2 foi negativamente correlacionada com a razão AsA/Ascorbato total.

No estilosante, a produção de massa seca da parte aérea e o concentração de clorofila total foram negativamente correlacionados com a concentração de H_2O_2 e com a razão AsA/Ascorbato total. A concentração de clorofila foi positivamente correlacionada com a razão GSH/Glutationa total. A concentração de H_2O_2 foi negativamente correlacionada com a razão GSH/Glutationa total. A produção de massa seca das raízes foi correlacionada positivamente com a razão AsA/Ascorbato total (Tabela 3). As razões AsA/Ascorbato total e GSH/Glutationa total são indicativos do estado de redução dos compostos. A razão AsA/Ascorbato total apresentou correlação negativa com a razão GSH/Glutationa total tanto nas folhas do capim e do estilosante quanto nas raízes do estilosante.

Tabela 3- Coeficientes de correlação entre índices fisiológicos de plantas de capim-tanzânia e estilosante crescidas sob disponibilidades de S, aos 28 dias de crescimento

Índices	Folhas				Raízes		
	Chl total	H_2O_2	AsA/Total	GSH/Total	H_2O_2	AsA/Total	GSH/Total
Capim							
Massa seca	0,84**	-0,75**	ns	0,59*	ns	ns	-0,65*
Chl total	-	-0,89**	ns	0,77*	-	-	-
H_2O_2	-	-	ns	-0,83**	-	-0,93**	-0,73*
AsA/Total	-	-	-	-0,87**	-	-	ns
Estilosante							
Massa seca	ns	-0,76*	-0,74*	ns	ns	0,77*	ns
Chl total	-	-0,92**	-0,95**	0,99**	-	-	-
H_2O_2	-	-	0,99**	-0,91**	-	ns	ns
AsA/Total	-	-	-	-0,93**	-	-	-0,90**

Chl total- Concentração de clorofila total; H_2O_2 - Concentração de peróxidos; AsA/Total- Razão AsA/(AsA+DHA); GSH/Total- Razão GSH/(GSH+GSSG). *P<0,05. **P<0,01. Ns- não significativo.

6.4 Discussões

A disponibilidade de S para as plantas influencia a reserva de glutathione, consequentemente pode ocasionar distúrbios no funcionamento do ciclo ascorbato-glutathione, que mantém a homeostase do potencial redox celular, controlando síntese, consumo e reciclagem de AsA e GSH (NOCTOR et al., 1998; SEMANE et al., 2007). Neste estudo foi investigado o impacto das disponibilidades baixa, intermediária e alta de S no crescimento, metabolismo da glutathione e na atividade das enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione das espécies forrageiras *Panicum maximum* cv. Tanzânia e *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão. Como o S é constituinte do metabólito GSH, está envolvido em reações de defesa contra o estresse oxidativo, como um antioxidante. A sua importância é ilustrada pelo fato de que a biossíntese de GSH é estimulada quando a célula encontra condições de estresse como se acumulasse a capacidade de defesa. A GSH é acumulada em resposta ao aumento da geração de ROS, ou para compensar a diminuição da capacidade de defesa de outros antioxidantes e concentrações de GSH são constitutivamente superiores em plantas adaptadas a condições de estresse. O adequado suprimento de S garante maior crescimento das plantas tornando-as mais produtivas, enquanto que plantas submetidas à deficiência de S tendem a induzir uma série de respostas de adaptação a essa limitação.

O crescimento das espécies forrageiras foi significativamente favorecido pelo fornecimento de S (Figura 1). A disponibilidade intermediária de S se revelou como a concentração ótima para ambas as espécies, pois aumentando o fornecimento de S para alta disponibilidade não foram observados acréscimos significativos na produção de massa fresca e nas concentrações de proteínas solúveis e de clorofila nas plantas. Em condições de crescimento sob intermediária disponibilidade de S as plantas de ambas as espécies apresentaram significativos acréscimos na altura da parte aérea, comprimento radicular e produção de massa em relação à baixa disponibilidade de S (Figura 1). Outra modificação relevante observada na parte aérea das plantas de capim e estilante nutridas com intermediária disponibilidade de S foi o aumento da área foliar em relação a plantas crescidas em disponibilidade baixa de S. Além de aumentar diretamente o potencial de produção de forragem, as folhas maiores são capazes de interceptar mais radiação luminosa, o que altera a eficiência de uso de luz e a capacidade fotossintética do dossel das plantas (HIROSE, BAZZAZ, 1998). O crescimento das plantas de ambas as espécies em disponibilidade baixa de S foi significativamente reduzido, afetando a produção de massa e a sua distribuição na

planta, ou seja, a relação massa da parte aérea/raízes (Tabela 1). A carência de S nas plantas de estilósante causou decréscimo na razão parte aérea/raízes em relação às plantas crescidas em disponibilidades intermediária e alta de S. Mollier e Pellerin (1999) sugeriram que a deficiência nutricional de N e P resulta em exportação preferencial de carboidratos para as raízes, causando o decréscimo na razão da massa da parte aérea/massa das raízes em plantas de milho (*Zea mays*). Provavelmente um mecanismo similar seja o responsável pelo decréscimo observado na razão massa da parte aérea/massa das raízes, em condições de limitação de S no estilósante (Tabela 1).

A síntese de proteínas em plantas de capim e estilósante aumentou com as disponibilidades intermediária e alta de S (Figura 2), em relação à baixa disponibilidade, o que se refletiu no maior crescimento da parte aérea e das raízes de ambas espécies e na concentração mais elevada de clorofila nas folhas recém-maduras (Figura 1). O estímulo promovido pelo S no crescimento e na multiplicação de células vegetais e na biossíntese da clorofila está relacionado com o aumento na concentração de proteína solúvel, uma vez que a maior parte do S absorvido pelas raízes é incorporado principalmente nos aminoácidos metionina e cisteína, e ambos atuam como elementos estruturais e funcionais de proteínas (DROUX, 2004). Por outro lado, a concentração de proteína solúvel mais baixa nas folhas de ambas as espécies quando crescidas em baixa disponibilidade de S prejudicou a formação de clorofila (Figuras 2A e 2B). O declínio de pigmentos cloroplásticos nas folhas jovens das plantas pode ser resultado do decréscimo tanto da biossíntese de proteínas nos cloroplastos quanto da importação de proteínas do citosol (LEUSTEK et al., 2000; GROSSMAN; TAKAHASHI, 2001; KOPRIVA, 2006). A baixa mobilidade do S das folhas velhas para tecidos mais jovens também pode limitar a síntese de proteínas nessas folhas (HAWKESFORD; DE KOK, 2006).

Vários estudos apontaram que plantas cultivadas em condições de deficiência de S apresentam decréscimos acentuados de fotossíntese (TERRY, 1976; DIETZ; HEILOS, 1990; KARMOKER et al., 1991; GILBERT et al., 1997), pois o S é constituinte do sistema ferredoxina (proteína Fe-S não-heme) e tioredoxina, onde desempenha papel fundamental para eficiente coordenação e operação do ciclo de Calvin com as reações luminosas nos cloroplastos (LEUSTEK; SAITO, 1999; SAITO, 2004). A limitação de S resulta na diminuição da evolução do O_2 e no declínio no fluxo de elétrons através do fotossistema II (GROSSMAN; TAKAHASHI, 2001). Deste modo, a limitação de S pode ocasionar decréscimo na síntese e atividade da Rubisco, na taxa de assimilação de CO_2 (XU et al., 1996; HAWKESFORD, 2000), na concentração de clorofila (TEWARI et al., 2004) e na atividade

da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase) (GIORDANO; PEZZONI; HELL, 2000). Os distúrbios ocasionados pela limitação de S nas reações da cadeia de transporte de elétrons e na fixação de CO₂ resultam em menor crescimento das plantas (JUSZCZUK; OSTASZEWSKA, 2011).

As plantas de ambas as espécies forrageiras crescidas sob baixa disponibilidade de S além de apresentarem mais baixa concentração de clorofila acumularam ROS sob a forma de H₂O₂ (Tabela 3). Certamente o aumento da formação de ROS em plantas sob condições de estresse nutricional, ocasionado pela limitação de S, induz respostas de proteção contra o estresse oxidativo. O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS deve ser mantida nas células para evitar distúrbios metabólicos ou oxidação excessiva (GILL; TUTEJA, 2010; ANJUM et al., 2012).

As plantas são dotadas de um eficaz sistema de defesa antioxidante, com componentes enzimáticos e não enzimáticos, onde o ciclo ascorbato-glutationa (ASA-GSH) é a via central para a eficiente remoção/metabolismo de ROS e, assim é importante para a manutenção da homeostase celular nas plantas sob condições de estresse oxidativo. Entre os antioxidantes não-enzimáticos, o tripeptídeo glutaciona (GSH) é considerado como o mais importante na defesa intracelular contra ROS (GILL; TUTEJA, 2010; ANJUM et al., 2012). A síntese de glutaciona pode ser dependente e/ou regulada pela disponibilidade de S para as plantas (FOYER; THEODOULOU; DEBROT, 2001; NIKIFOROVA et al., 2003).

No presente estudo, o fornecimento de S na concentração intermediária favoreceu a síntese de glutaciona em folhas do capim e do estilosante, sobretudo na fase final de crescimento (Figuras 5A, 5B e 5C). Estes resultados demonstram que as disponibilidades intermediária e alta de S beneficiam a síntese de cisteína, aminoácido necessário para a síntese da glutaciona. Resultados mostrados previamente no capítulo 4 desse estudo demonstraram aumento na concentração de cisteína nas folhas do capim e do estilosante crescidos em intermediária (+40% no capim e +46% no estilosante) e alta disponibilidade (+23% no capim e +38% no estilosante) de S em comparação à baixa disponibilidade de S. Por outro lado, aos 14 dias de crescimento, a limitação de S também promoveu o aumento da concentração de glutaciona nas folhas de ambas as espécies. Segundo Foyer e Noctor (2001), a síntese da glutaciona é induzida em condições de estresse nutricional como mecanismo de proteção contra danos oxidativos, o que explica o aumento da concentração de glutaciona nas folhas de plantas carentes em S. As raízes do capim e do estilosante crescidas em baixa disponibilidade de S também apresentaram concentrações mais elevadas de glutaciona (Figuras 5B e 5C). O aumento da concentração de glutaciona nas raízes das plantas com carência de S pode estar

relacionado com a translocação da glutathione das folhas para as raízes. Estudos de Rennenberg, Schmitz e Bergman (1979) e Rennenberg (1984, 1995) mostraram que a glutathione é a forma tiólica predominantemente translocada de folhas expandidas para as raízes, via floema, quando há demanda de S e também em condições de estresse.

Os componentes não enzimáticos do sistema de defesa antioxidante referem-se sobretudo à glutathione na forma reduzida (GSH) e ao ascorbato reduzido (AsA), sendo a GSH requerida na regeneração do AsA. Nesta regeneração, a DHAR cataliza a redução do DHA a AsA com simultânea oxidação da GSH a GSSG. A DHAR teve aumento significativo e consistente nas raízes do capim e do estilante crescidas em baixa disponibilidade de S (Figuras 8D e 9B). A atividade elevada da DHAR é indicativa de resposta das plantas à condição de estresse nutricional de S, que causam danos oxidativos nas plantas, e de que foi formado DHA em quantidade elevada, por dissociação espontânea do monodesidroascorbato (MDHA), resultante da ação da APX. A MDHAR, outra enzima que atua na regeneração do AsA, reduzindo o MDHA a AsA com a utilização do NAD(P)H, apresentou aumento significativo nas raízes do capim, aos 14 dias de crescimento. O acréscimo da atividade da DHAR e MDHAR indica que tanto a primeira quanto a segunda parte do ciclo ascorbato-glutathione atuaram para a manutenção do ascorbato na forma reduzida (Figuras 8 e 9).

A GR, enzima que catalisa a conversão de GSSG em GSH, apresentou atividade elevada nas folhas e raízes do capim crescido em baixa disponibilidade de S (Figuras 8A e 8B), mostrando-se eficiente na manutenção da homeostase celular da glutathione reduzida nessas plantas, tendo conduzido a altas concentrações de glutathione total e GSH. No capim, em condição de carência de S, a GR apresentou importante função no metabolismo antioxidativo das plantas, auxiliando a manutenção da concentração de GSH (Figuras 5A e 5B). No estilante, a GR também teve atividade significativamente elevada nas raízes de plantas carentes em S, mantendo a glutathione predominantemente na forma reduzida (Figura 5C). No capim e no estilante, o aumento da concentração do substrato glutathione, principalmente nas raízes das plantas crescidas sob carência de S, favoreceu a eficiente atuação da GR e da DHAR na regeneração do AsA por meio do ciclo ascorbato-glutathione completo (Figuras 5, 8B, 8D, 9A e 9B).

Além da GR, existem várias enzimas que direta ou indiretamente desempenham papéis cruciais na remoção do excesso de ROS, nomeadamente SOD, APX e CAT. O acréscimo na atividade destas enzimas antioxidativas (Figuras 6 e 7) nas plantas de capim e estilante crescidas em baixa disponibilidade de S confirma, indiretamente, a presença dos ROS superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente. A SOD faz parte da primeira linha de

defesa contra ROS, eliminando o radical superóxido (O_2^-) do metabolismo celular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Todavia, quando a eliminação não é total, parte das moléculas do radical superóxido podem, juntamente com H_2O_2 , originar a hidroxila ($HO\bullet$). Este radical é considerado o oxidante celular mais potente sendo, provavelmente, o responsável pela peroxidação de lipídios nas membranas e pela destruição de várias macromoléculas, causando sérios danos aos componentes celulares (SCANDALIOS, 1993). A atividade da SOD é, portanto, fundamental para a manutenção da concentração do radical O_2^- em níveis que não causem danos ao metabolismo celular. O aumento da atividade da SOD observado nas raízes do capim com carência nutricional de S aos 14 dias representa, portanto, um mecanismo de defesa antioxidativo eficiente nessa condição (Figura 6B). No estilósante, a maior atividade da SOD ocorreu nas folhas e raízes de plantas crescidas por 28 dias em baixa disponibilidade de S (Figura 7A). O equilíbrio entre a SOD e as outras enzimas removedoras de H_2O_2 nas células é crucial para a manutenção do estado estacionário do nível de O_2 e H_2O_2 (MITTLER et al., 2004).

A ativação das enzimas APX e CAT no estilósante foi eficiente na detoxificação de H_2O_2 gerado pelo estresse oxidativo causado pela limitação de S. A APX e a CAT também foram eficientes na eliminação de H_2O_2 nas raízes e folhas de plantas de capim deficientes em S até os 21 dias de crescimento, mantendo os níveis de H_2O_2 mais baixos ou similares aos de plantas bem nutridas em S. A APX decompõe H_2O_2 , utilizando o AsA reduzido como potencial redutor (SMIRNOFF, 2000). O aumento da atividade da APX em plantas de capim e estilósante deficientes em S está de acordo com os resultados com *Arabidopsis thaliana* (KANDLBINDER et al., 2004). A CAT apresenta baixa afinidade por H_2O_2 , no entanto, em condições de estresse oxidativo, quando a capacidade de eliminação de H_2O_2 pela ação de outras enzimas como a APX é superada, a CAT pode atuar diretamente na eliminação de H_2O_2 (MITTLER, 2002). Os resultados mostraram que, embora tenha ocorrido o aumento da atividade da APX e da SOD em plantas crescidas em baixa disponibilidade de S, a CAT também exerceu papel significativo na detoxificação de H_2O_2 , principalmente no capim aos 14 dias de crescimento (Figuras 6C e 6D).

O balanço relativo do AsA e DHA é muito importante para o funcionamento do ciclo ascorbato-glutationa. O AsA atua como doador de elétrons para a APX catalisar a redução de H_2O_2 . Isto indica que a alta eficiência de remoção de espécies reativas de oxigênio está correlacionada à alta capacidade de regenerar o AsA. Aos 28 dias de crescimento, a razão GSH/Glutationa total foi negativamente correlacionada com a razão AsA/Ascorbato total nas

folhas do capim e nas folhas e raízes do estilosante, pois a concentração de GSSG aumentou quando a GSH foi utilizada como substrato na regeneração do AsA.

6.5 Conclusões

A baixa disponibilidade de S prejudica o crescimento de ambas as espécies forrageiras e causa diminuição da produção de massa e da concentração protéica na planta forrageira. A limitação de S induz a atividade de enzimas antioxidantes que atuam na regeneração da GSH e do AsA, visando combater o estresse oxidativo. As plantas crescidas sob baixa disponibilidade de S apresentam aumento da síntese de glutathione e translocação de glutathione para as raízes, como resposta ao estresse oxidativo.

Referências

- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1331-1341, 2002.
- ANDERSON, J.; CHEVONE, B.; HESS, J. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles: evidence for thermal dependence. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, p. 501-508, 1992.
- ANJUM, A.N.; AHMAD, I.; MOHMOOD, I.; PACHECO, M.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, E.; UMAR, S.; AHMAD, A.; KHAN, N. A.; IQBAL, M.; PRASAD, M.N.V. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—A review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.75, p.307-324, 2012.
- ARRIGONI, O.; DIPIERRO, S.E.; BORRACCINO, G. Ascorbate free radical reductase: a key enzyme of the ascorbic acid system. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.125, p.242-244, 1981.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- BROWN, L.; SCHOLEFIELD, D.; JEWKES, E.C.; PREEDY, N.; WADGE, K.; BUTLER, M. The effect of sulphur application on the efficiency of nitrogen use in two contrasting grasslands soils. **Journal Agricultural Science**, New York, v. 135, p. 131-138, 2000.
- DALTON, D.A.; BAIRD, L.M.; LANGEBOURG, L.; TAUGHET, C.Y.; ANYAN, W.R.; VANCE, C.V.; SARATH, G. Subcellular localization of oxygen defence enzymes in soybean (*Glycine max* L. Merr.) root nodules. **Plant Physiology**, Rockville, v.102, p.481-489, 1993.
- DIETZ, K.-J.; HEILOS, L. Carbon metabolism in spinach leaves as affected by leaf age and phosphorus and sulfur nutrition. **Plant Physiology**, Rockville, v.93, p.1219-1225, 1990.

DROUX, M. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. **Photosynthesis Research**, Wageningen, v.79, p.331-348, 2004.

FOYER, C.H. Ascorbic acid. In: ALSCHER, E.G.; HESS, J.L. (Ed.). **Antioxidants in higher plants**. Florida: CRC Press, 1993. p.32-54.

FOYER, C.H.; LELANDAI, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.92, p.696-717, 1994.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. The molecular biology and metabolism of glutathione . In: GRILL, D.; TAUSZ, M.; DE KOK, L. J. (Ed.). **Significance of glutathione in plant adaption to the environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.27-56.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.28, p.1056-1071, 2005.

FOYER, C.H.; THEODOULOU, F.L.; DELROT, S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. **Trends in Plant Science**, London, v.6, p.486-492, 2001.

GILBERT, S.M.; CLARKSON, D.T.; CAMBRIDGE, M.; LAMBERS, H.; HAWKESFORD, M.J. SO_4^{2-} deprivation has an early effect on the content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthesis in young leaves of wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v.115, p.1231-1239, 1997.

GILBERT, M.A.; ROBSON, A.D. The effect of sulfur supply on the root characteristics of subterranean clover and annual ryegrass. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.77, p.377-380, 1984.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.48, p.909-930, 2010.

GIORDANO, M.; PEZZONI, V.; HELL, R. Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.857-864, 2000.

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

GROSSMAN, M.; TAKAHASHI, H. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.163-210, 2001.

HAWKESFORD, M.J. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.131-138, 2000.

HAWKESFORD, M.J., DE KOK, L.J. Managing sulphur metabolism in plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.29, p.382-395, 2006.

HERSCHBACH, C.; RENNENBERG, H. Influence of glutathione on net uptake of sulphate transport in tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.1069-1076, 1994.

_____. Storage and remobilization of sulphur in beech trees (*Fagus sylvatica*). **Physiologia Plantarum**, Malden, v.98, p.125-132, 1996.

HIROSE, T.; BAZZAZ, F.A. Trade-off between light- and nitrogen-use efficiency in canopy photosynthesis. **Annals of Botany**, London, v.82, p.195-202, 1998.

HIXCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G.F.A. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.57, p.1332-1334, 1978.

HOSSAIN, M.A.; ASADA, A. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.25, p.1285-1295, 1984.

JIANG, Z. J.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. **Febs Letters**, Heidelberg, v.268, p.69-71, 1990.

JUSZCZUK, I.M.; OSTASZEWSKA, M. Respiratory activity, energy and redox status in sulphur-deficient bean plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.74, p.245-254, 2011.

KANDLBINDER, A.; FINKEMEIER, I.; WORMUTH, D.; HANITZSCH, M.; DIETZ, K.-J. The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.120, p.63-73, 2004.

KARMORKER, J.L.; CLARKSON, D.L.; SAKER, L.R.; ROONEY, J.M.; PURVES, J. V. Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. **Planta**, New York, v.185, p.269-278, 1991.

KHAN, N.A.; ANJUM, N.A.; NAZAR, R.; IQBAL, N. Increased activity of ATPsulfurylase, contents of cysteine and glutathione reduce high cadmium-induced oxidative stress in high photosynthetic potential mustard (*Brassica juncea* L.) cultivar. Russ. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.56, p.670-677, 2009.

KNOP, M.; PACYNA, S.; VOLOSHCHUK, N.; KANT, S.; MULLENBORN, C.; STEINER, U.; KIRCHMAIR, M.; SCHERER, H. W.; SCHULZ, M. Zea mays: benzoxazolinone detoxification under sulphur deficiency conditions-a complex alleopathic alliance including endophytic *Fusarium verticillioides*. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v.33, p.225-237, 2007.

KOPRIVA, S. Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. **Annals of Botany**, London, v.97, p.479-495, 2006.

KRUSE, C.; JOST, R.; LIPSCHIS, M.; KOPP, B.; HARTMANN, M.; HELL, R. Sulphur enhanced defense: effects of sulphur metabolism, nitrogen supply, and pathogen life style. **Plant Biology**, Malden, v.9, p.608-619, 2007.

LEUSTEK, T.; SAITO, K. Sulfate transport and assimilation in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.120, p.637–643, 1999.

LEUSTEK, T.; MARTIN, M.N.; BICK, J.-ANN; DAVIES, J.P. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.141-165, 2000.

MADHAVARAO, K.V.; SREESTY, T.V.S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, Amsterdam, v.157, p.113–128, 2000.

MAY, M.J.; VERNOUX, T.; LEAVER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.649–667, 1998.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v.244, p.6049-6055, 1969.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.7, p.405-409, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, London, v.9, p.490-498, 2004.

MOLLIER, A.; PELLERIN, S. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.50, p.487-497, 1999.

NAZAR, R.; IQBAL, N.; MASOOD, A.; SYEED, S.; KHAN, N. A. Understanding the significance of sulfur in improving salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.70, p.80-87, 2011.

NIKIFOROVA, V.J.; FREITAG, J.; KEMPA, S.; ADAMIK, M.; HESSE, H.; HOEFGEN, R. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. **Plant Journal**, Malden, v.33, p.633-650, 2003.

NIKIFOROVA, V.J.; KOPKA, J.; TOLSTIKOV, V.; FIEHN, O.; HOPKINS, L.; HAWKESFORD, M.J.; HESSE, H.; HOEFGEN, R. System rebalancing of metabolism in response to sulphur deprivation, as related by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.138, p.304–318, 2005.

NOCTOR, G.; ARISI, A.C.; JOUANIN, L.; KUNERT, K.J.; RENNEMBERG, H.; FOYER, C.H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.623-647, 1998.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249–279, 1998.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.A.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1283–1304, 2002.

OKAMURA, M. An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.103, p.259-268, 1980.

PÉREZ, C. Técnicas estadísticas con SPSS 12. **Aplicaciones al análisis de datos**. ISBN 84-205-4410-8. Pearson Educación AS (Ed) Spain, 2005.

PORRA, R.; THOMPSON, W.A.; KRIEDMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.975, p.384-394, 1989.

POTTERS, G.; DE GARA, L.; ASARD, H.; HOREMANS, N. Ascorbate and glutathione of the cell cycle, partners in crime? **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, p.537-548, 2002.

RENNENBERG, H. The fate of excess sulfur in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.35, p.121-153, 1984.

_____. Processes involved in glutathione metabolism. In: WALLSGROVE, R. M.(Ed.) **Amino acids and their derivatives in higher plants- Biosynthesis and metabolism**, Cambridge University Press, Cambridge, 1995, p.155-171.

RENNENBERG, H.; SCHMITZ, K.; BERGMAN, L. Long distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. **Planta**, New York, v.176, p.68-74, 1979.

RICHARDSON, A.D.; DUIGAN, S.P.; BERLYN, G.P. An evaluation of non invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, Lancaster, v.153, p.185-194, 2002.

SAITO, K. Sulfur assimilatory metabolism, the long and smelling road. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, p.2443-2450, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, p.7-12, 1993.

SCHAEDELE, M.; BASSHAM, J.A. Chloroplast glutathione reductase. **Plant Physiology**, Rockville, v.59, p.1011-1012, 1977.

SEMANE, B.; CUYPERS, A.; SMEETS, K.; VAN BELLEGHEM, F.; HOREMANS, N.; SCHAT, H.; VANGRONVELD, J. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.129, p.519-528, 2007.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, p.229-235, 2000.

SZALAI, G.; KELLOS, T.; GALIBA, G.; KOCSY, G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. **Journal Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.28, p.66-80, 2009.

TALLEC, T.; DIQUELOU, S.; AVICE, J. C.; LESUFFLEUR, F.; LEMAUVIEL-LAVENANT, S.; CLIQUET, J. B.; OURRY, A. Availability of N and S affect nutrient acquisition efficiencies differently by *Trifolium repens* and *Lolium perenne* when grown in monoculture or in mixture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.66, p.309-316, 2009.

TAUSZ, M.; SIRCELJ, H.; GRILL, D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1955-1962, 2004.

TERRY, N. Effects of sulfur on the photosynthesis of intact leaves and isolated chloroplasts of sugar beets. **Plant Physiology**, Rockville, v.57, p.477-479, 1976.

TEWARI, R.K.; KUMAR, P.; TEWARI, N.; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, P.N. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses—influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. **Plant Science**, Amsterdam, v.166, p.687-694, 2004.

XU, H.L.; LOPEZ, J.; RACHIDI, F.; TREMBLAY, N.; GAUTHIER, L.; DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A. Effect of sulphate on photosynthesis in greenhouse-grown tomato plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.96, p.722–726, 1996.

7 ESTADO NUTRICIONAL EM ENXOFRE AFETA A ABSORÇÃO E A EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE SULFATO EM CAPIM-TANZÂNIA E ESTILOSANTE MINEIRÃO NO PERÍODO VEGETATIVO

Resumo

A plasticidade fisiológica das plantas para aumentar ou diminuir a capacidade de absorção de enxofre, de acordo com a disponibilidade do nutriente é atribuída à regulação dos transportadores de sulfato na membrana plasmática das raízes das plantas. No entanto, a resposta das plantas depende da espécie vegetal, sendo o fator preponderante a exigência nutricional relacionada ao elemento. O presente estudo foi desenvolvido visando determinar os efeitos da limitação e suficiência de enxofre no estado nutricional do *Panicum maximum* cv. Tanzânia e o *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e na absorção de sulfato e na expressão de transportadores de sulfato. A absorção de sulfato e a expressão relativa dos transportadores foram reguladas de forma diferenciada no capim e no estilosante. No capim a maior produção de biomassa na parte aérea das plantas crescidas em suficiência de enxofre parece estar associada com a maior absorção de ^{34}S e principalmente com a maior expressão do sistema de transporte de alta afinidade. O aumento da concentração de glutathione nas raízes e o menor influxo total de ^{34}S foram identificados como respostas específicas do capim para a limitação do enxofre. No estilosante, as mais baixas concentrações de sulfato e enxofre total nas raízes e na parte aérea das plantas parecem controlar o influxo de ^{34}S na planta em condição de limitação de enxofre de modo a suprir a demanda nutricional em enxofre pelas plantas. Altas concentrações de glutathione nas raízes do estilosante não ocasionaram a redução da absorção de sulfato. A expressão relativa dos transportadores de sulfato nas raízes e principalmente nas folhas do estilosante foi altamente reprimida pela limitação de enxofre.

Palavras-chave: Absorção de sulfato; Glutathione; Limitação de enxofre; ^{34}S marcado; Transportadores de sulfato

Abstract

Plant physiological plasticity to increase or decrease the absorption capacity of sulfur, related to nutrient availability is attributed to the regulation of sulfate transporters in the plasma membrane of plant roots. However, plant response depends on the species and nutritional requirements related to the element is a main factor. This study was undertaken to determine the effects of sulfur limitation and adequate supply in *Panicum maximum* cv. Tanzania and *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão on the absorption of sulfate and sulfate transporters expression. The absorption and relative expression of sulfate transporters were differently regulated in the Guinea grass and stylo. In Guinea grass, higher biomass production in shoots of plants grown in sulfur sufficiency appears to be associated with greater absorption of ^{34}S and especially with the increased expression of the high affinity transport system. The increased of glutathione concentration in the roots and lower ^{34}S total influx were identified as the specific responses for limiting sulfur supply to the grass. Low sulfate and total sulfur concentrations in roots and shoots seems to control the ^{34}S influx in stylo plants grown under sulfur limitation. High glutathione concentrations in stylo roots did not cause reduction in sulfate absorption. Relative expression of sulfate transporters in roots and mainly in leaves of stylo was highly suppressed by sulfur limiting supply.

Keywords: Glutathione; ^{34}S labeling; Sulfate uptake; S transporters; Sulfur limitation

7.1 Introdução

O enxofre (S) está disponível para as plantas principalmente na forma de sulfato, a qual é absorvida pelas raízes. Antes de ser utilizado na síntese de proteínas, o sulfato absorvido deve ser reduzido, cuja assimilação redutora do sulfato a sulfeto é um processo dependente da luz e ocorre principalmente nos tecidos verdes das folhas (BRUNOLD, 1993). O sulfeto proveniente da redução do sulfato nos cloroplastos é a forma de S metabolicamente útil para a planta, sendo utilizado nos plastídeos, mitocôndrias e citosol para sintetizar a cisteína (KOPRIVA, 2006). A cisteína é diretamente incorporada em peptídeos e proteínas, ou serve como doador de S reduzido para a síntese da metionina, da glutathione, de compostos secundários de S e de fitoquelatinas que desintoxicam metais pesados (KOPRIVA; WIEDEMANN; RESKI, 2007).

Além de muitas outras funções metabólicas, a glutathione funciona também como sinalizadora na regulação da absorção de sulfato e da translocação para a parte aérea (LAPPARTIENT; TOURAINE, 1996; HERSCHBACH et al., 2000; WESTERMANN et al., 2000), bem como na redução de sulfato (HAWKESFORD, 2000). Como é a principal forma de estoque e de transporte de S reduzido em plantas herbáceas, a glutathione é transportada para os locais de demanda por S reduzido para o crescimento e o desenvolvimento (BONAS et al., 1982) incluindo o tecido heterotrófico das raízes (FARAGO e BRUNOLD, 1990). Nas raízes, a glutathione translocada da parte aérea parece atuar como um sinal do estado nutricional de S da planta (RENNENBERG, 1995) e aparentemente regula a absorção de sulfato e o carregamento para o xilema (HERSCHBACH; RENNENBERG, 2001).

A influência da concentração da glutathione no controle da absorção de S-sulfato pela planta ainda não é consenso entre os pesquisadores. Diversos trabalhos demonstram que o acúmulo da glutathione regula negativamente a absorção de S pela planta (HERSCHBACH; RENNENBERG, 1991; 1994; LAPPARTIENT et al., 1999; MARUYAMA-NAKASHITA et al., 2004; ROUACHED et al., 2008), enquanto outros apontam que o aumento da glutathione incrementa a taxa de absorção de sulfato pelas raízes do vegetal (SMITH et al., 1985; KOCSY et al., 1996). Estudos realizados em plantas inteiras (HERSCHBACH; RENNENBERG, 1994) demonstraram que a glutathione reprime a taxa de absorção de sulfato e/ou taxas de carregamento de sulfato no xilema em plantas herbáceas. No entanto, ambos os processos parecem ser regulados de forma diferenciada (HERSCHBACH; RENNENBERG, 1991, 1994, 2001). A fumigação de H_2S na parte aérea das plantas também provoca o aumento nas concentrações de glutathione nas raízes, mas a absorção de sulfato e o carregamento do xilema

dependem das espécies analisadas e do estado nutricional de S (HERSCHBACH; DE KOK; RENNENBERG, 1995a, 1995b; WESTERMANN et al., 2000).

A expressão de transportadores de sulfato de elevada afinidade específica na raiz se mostraram dependentes da concentração de glutathione em *Arabidopsis thaliana* (VIDMAR et al., 2000). Nas raízes de *Arabidopsis*, a expressão de um transportador de sulfato de baixa afinidade responsável pelo carregamento de sulfato no xilema também foi afetado pela glutathione (LAPPARTIENT et al., 1999).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de estudar a importância do estado nutricional em S nas espécies forrageiras tropicais durante o crescimento vegetativo no que se refere à ação reguladora do estado nutricional de S na absorção do sulfato e expressão de transportadores de sulfato. Presumiu-se que o fornecimento de S na forma reduzida a partir das folhas para as raízes possa influenciar a absorção de S pelas raízes para satisfazer a demanda de S nos tecidos em crescimento. Para responder a estas hipóteses foram avaliados: i) estado nutricional em S das raízes e da parte aérea, sendo avaliadas as concentrações de S total, S-sulfato e glutathione, ii) absorção de ^{34}S e iii) expressão de transportadores de sulfato.

7.2 Material e métodos

7.2.1 Estudo de influxo de ^{34}S

Dois experimentos foram realizados em câmara de crescimento para avaliar o influxo de ^{34}S em plantas de *Panicum maximum* cv. Tanzânia (capim-tanzânia) e *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão (estilosante Mineirão) submetidas à oferta limitante e suficiente de S na solução nutritiva. As sementes foram germinadas no escuro entre papéis de filtro umedecidos com água deionizada. Após sete dias, três plântulas de cada espécie foram transferidas para vasos com capacidade de 2,7 L (três mudas por vaso) contendo solução nutritiva. As plantas foram cultivadas hidroponicamente sob condições de aeração, em câmara de crescimento com condições de 16/8 h de luz / escuro, intensidade de luz 250 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura 30/20° C e 60% de umidade relativa do ar.

A composição da solução nutritiva foi ajustada para atender a oferta de S [limitante: 0,10 mmol L^{-1} para ambas as espécies; suficiente: 1,00 mmol L^{-1} para o capim e 1,30 mmol L^{-1} para estilosante]. A solução nutritiva foi composta de 1 mmol L^{-1} KH_2PO_4 , 5 mmol L^{-1} KCl, 2 mmol L^{-1} de KNO_3 , 5 mmol L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 9 mmol L^{-1} de NH_4NO_3 , 46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_3BO_3 , 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MnCl_2 , 0,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ZnCl_2 , 0,30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuCl_2 , 0,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{H}_2\text{MoO}_4 [\text{H}_2\text{O}]$ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fe(III)-EDTA. O S na solução nutritiva foi

fornecido pelo sal MgSO_4 . A concentração de magnésio (Mg^{2+}) foi ajustada em todas as doses de S utilizando uma solução de MgCl_2 , de modo que a concentração final de Mg^{2+} fosse 2 mmol L^{-1} . A solução nutritiva foi renovada a cada 7 dias e o pH foi tamponado (pH próximo a 7) com bicarbonato de cálcio.

As plantas de capim-tanzânia e estilosante Mineirão foram crescidas durante 28 dias em solução nutritiva com as respectivas ofertas de S antes da realização dos estudos de influxo do ^{34}S . Para os experimentos de influxo do ^{34}S , as plantas intactas pré-tratadas com as doses de S foram colocadas em 2,5 L de solução nutritiva marcada, contendo água deionizada e 2 mmol L^{-1} de $^{34}\text{SO}_4$ como $\text{K}_2^{34}\text{SO}_4$ (11,5% átomos de ^{34}S). A marcação da planta ocorreu durante duas horas. Após as raízes foram lavadas durante dois minutos com água deionizada e separadas da parte aérea. O material vegetal foi seco em estufa com circulação forçada a 65°C , durante 72 horas. O material seco foi moído para um pó fino usando um moinho de café (MDR Modelo 301, Cadence, BR). Aliquotas de 500 mg de material vegetal triturado foram utilizadas para medições isotópicas de ^{34}S . A determinação do ^{34}S nas plantas foi realizada utilizando um espectrômetro de massa (ATLAS MAT, modelo CH-4, Berlin, GE) (BENDASSOLLI; TRIVELIN; CARNEIRO JUNIOR, 1997).

Os estudos de influxo de ^{34}S foram realizados utilizando três repetições por pré-tratamento de S. A concentração de S no tecido vegetal derivado da solução nutritiva contendo ^{34}S (isótopo estável) foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{S absorvido} = \left(^{34}\text{S}\% \text{ de átomo em excesso na parte da planta} \right) / \left(^{34}\text{S}\% \text{ átomo em excesso na solução nutritiva} \right) \times \left(\text{concentração de S na planta} \right).$$

7.2.2 Determinação de S total, S- sulfato e glutathiona

A concentração de S total na parte aérea e raízes das plantas foi determinada conforme metodologia descrita por Tabatabai (1982). O extrato usado para a determinação S foi obtido via digestão nítrico-perclórica, a partir do qual foi determinado o S pelo método da turbidimetria do cloreto de bário.

A concentração de S-sulfato na parte aérea e raízes das plantas foi determinada conforme a metodologia modificada de Sinclair (1974). Assim, colocou-se 1 g de massa seca em erlenmeyer e adicionaram-se 25 mL de solução extratora contendo ácido acético glacial, ácido clorídrico e ácido ortofosfórico. Após 30 minutos de agitação (200 rpm) em mesa agitadora, filtrou-se o conteúdo do erlenmeyer através de papel de filtro e pipetaram-se 2 mL desse extrato para tubo que foi colocado em destilador de S adaptado de Johnson e Nishita (1952), adicionando-se 4 mL de uma solução redutora à base dos ácidos iodídrico,

hipofosforoso e fórmico. Na outra extremidade do aparelho colocou-se um tubo com 40 mL de água deionizada + 10 mL de uma solução receptora à base de acetato de sódio e zinco [NaOAc-Zn(OAc)₂]. O extrato foi destilado por uma hora em bloco de aquecimento a 100°C, onde o S-sulfato contido no extrato foi convertido a sulfeto, que foi coletado na solução receptora. Procedeu-se a transferência da solução receptora contendo o sulfeto para balão de 100 mL ao que se adicionaram 10 mL de *p*-aminodimetilanilina + 2 mL de sulfato férrico e completou-se o volume com água deionizada. Após 20 minutos de repouso, procedeu-se a leitura do S-sulfato em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 670 nm.

A glutathione foi extraída por moagem de 1 g de material vegetal (com almofariz, pilão e areia de quartzo) em 3 mL de solução contendo 1 g L⁻¹ de ácido sulfossalicílico, na presença de N₂ líquido. Os homogeneizados foram centrifugados a 11000 x g durante 20 minutos a 4°C. O extrato foi armazenado a -80°C para as determinações da glutathione. A concentração de glutathione total no tecido vegetal foi determinada por colorimetria pelo método descrito por Anderson (1985). Para essa determinação utilizou-se 0,25 mL de extrato proteico acrescido de 1,75 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e 0,1 mL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico - DTNB) 3 mmol L⁻¹. Na solução foram acrescidos 100 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) 0,4 mmol L⁻¹ e 2 µL de glutathione redutase (Tipo III, Sigma) com concentração final na cubeta de leitura do espectrofotômetro de 0,5 unidade mL⁻¹, após 20 minutos de reação, realizou-se leitura da absorbância a 412 nm.

7.2.3 Extração de Rna

O RNA total foi extraído a partir de 200 mg de massa fresca de folhas e raízes. O RNA total das raízes do capim-tanzânia foi extraído segundo o método descrito por Aragón et al. (2009). O RNA total de folhas do capim-tanzânia e do estilante foi extraído utilizando o Kit *Spectrum Plant Total RNA* (Kit Sigma-Aldrich, Inc.). A quantificação do RNA total foi realizada por meio de espectrofotometria a 260 nm, utilizando o software Gen5 1.09 (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Winooski, EUA) antes da transcrição reversa e análises quantitativas de PCR (qPCR).

7.2.4 Transcrição reversa e análise rt-qPCR do genes que codificam transportadores de sulfato

A transcrição reversa foi realizada utilizando 0,75 µg de RNA da amostra vegetal, 1 µL de oligo dT20 para obtenção de cDNA (DNA complementar), água de modo que o volume total de reação foi 20 µL e a enzima transcriptase reversa RevertAid (Fermentas Life

Science, Helsingborg, Suécia) de acordo com as recomendações do fabricante e, em seguida, o cDNA foi armazenado a -20° C até a sua utilização.

Para encontrar genes homólogos das espécies *Panicum maximum* e *Stylosanthes guianensis* várias sequências conhecidas de transportadores de sulfato de plantas foram obtidas do banco de dados *GenBank* (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, MD) e alinhadas com o software *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para encontrar domínios conservados para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers). As espécies utilizadas para os alinhamentos foram *Stylosanthes hamata* para *Stylosanthes guianensis* e *Brachypodium*, *Oryza sativa* e *Triticum aestivum* para *Panicum maximum*.

Para a amplificação via rt-qPCR (PCR quantitativa em tempo real), em *Panicum maximum* foram utilizados os primers TaSultr1, TaSultr2 e TaSultr3 que foram obtidos a partir de: sequência TaSultr1;1b (número de acesso: AJ512820), sequência TaSultr1;3 (número de acesso: BT009249), sequência TaSultr2;1 (número de acesso: TC366953/TC291347), sequência TaSultr3;2 (número de acesso: FN599528), sequência TaSultr3;3 (número de acesso: TC272130/TC259376), sequência TaSultr3;4 (número de acesso: TC318325/TC314180), sequência TaSultr3; 5 (número de acesso: AM747385) (Tabela 1). O gene da actina (número de acesso: TC234027) foi utilizado como gene de controle interno e foi amplificado utilizando os iniciadores descritos a seguir.

Tabela 1- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no *Panicum maximum*

<i>Panicum maximum</i>				
Gene	No de acesso	Sequência oligonucleotídica	Cadeia	Tamanho
Actin	TC234027	5' CATCCTTCGTCTTGACCTCG 3'	Senso	178
		5' GCTGCTCTTGGCATTTTCC 3'	Antisenso	
TaSultr1;1b	AJ512821.1	5' GGGCAGTTCCAGGGACATA 3'	Senso	166
		5' GAATCCGAGCATTGCCTGA 3'	Antisenso	
TaSultr2;1	TC366953	5' CCGCAGAGCATTGGATACG 3'	Senso	224
		5' AAGGTGACGGTGAAGACGAG 3'	Antisenso	
TaSultr3;2	FN599528.1	5' GCACAACAACAAGGAGATGGTC 3'	Senso	255
		5' AAGTCAAAGACGCCCAGCA 3'	Antisenso	
TaSultr3;3	TC423589	5' CCAAGGCTTTTCTGGGTGT 3'	Senso	282
		5' AAGTCAAAGACGCCCAGCA 3'	Antisenso	
TaSultr3;4	TC410468	5' TCGATTTCTGTCCAAGGC 3'	Senso	172
		5' GAGGTCGGACTTGAAGAGGG 3'	Antisenso	
TaSultr3;5	AM747385	5' GTTCAGAGGCAAGGAGGGA 3'	Senso	211
		5' ACCCCGAACCCTTTGTGAT 3'	Antisenso	

Para o *Stylosanthes guianensis*, os primers utilizados foram SHST1, SHST2, SHSTLA, Vv-ST4, HAST e STRL e foram obtidos a partir de: sequência SHST1 (número de acesso: X82255.1), sequência SHST2 (número de acesso: X82256.1), sequência SHSTLA (número de acesso: X82454.1) previamente publicados por Smith et al. (1995), sequência Vv-ST4 (número de acesso: XM_002282455.1), sequência HAST (número de acesso: XM_002268887.1) e sequência STRL (número de acesso: XM_002285774.2). O gene Vv-actina (número de acesso: AF369525.1) foi utilizado como gene de controle interno e foi amplificado utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com o software Primer3 (disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Tabela 2- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no *Stylosanthes guianensis*

<i>Stylosanthes guianensis</i>				
Gene	No de acesso	Sequência oligonucleotídica	Cadeia	Tamanho
Vv-Actin	AF369525.1	5' TGGATTCTGATGGTGTGAGTC 3'	Senso	167
		5' CAATTTCCCGTTTCAGCAGTAGTGG 3'	Antisenso	
Vv-HAST	XM_002268887.1	5'GATTGGAAGTATGTTGCAGGATGTG 3'	Senso	165
		5'CCGACAATAGCAGCATGAGATAAGA3'	Antisenso	
Vv-STRL	XM_002285774.2	5'CCTTTTTGGGTTTTCTTCTATTTGC 3'	Senso	125
		5'ACGGGTAATGTACACGAAGAAGGTA3'	Antisenso	
Vv-ST4	XM_002282455.1	5' CATCTGATGAAGTATACACGGAAGT 3'	Senso	163
		5' GATAAGGCAATCACAATTGCTGAAG 3'	Antisenso	
SHST1	X82255.1	5' TGGGAGCATTCTTTGGTGTGTC3'	Senso	175
		5' TGTGCTGCTTTGGGGTATTG 3'	Antisenso	
SHST2	X82256.1	5' CCTCTTGCTTGGGACTTTGC 3'	Senso	290
		5' GCACATTGCTCCAAACCGA 3'	Antisenso	
SHSTLA	X82454.1	5' TGGACCTGTGGCTGTTGTG 3'	Senso	261
		5' AAGTGAGTGAGCCCCAGCA 3'	Antisenso	

Para determinar a temperatura ótima de emparelhamento da PCR (reação em cadeia da polimerase) foi testado o gradiente de 42 a 60°C. Os parâmetros selecionados para o teste foram: 95°C por 3 minutos, em seguida, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 30 segundos de emparelhamento, e 72°C por 1 minuto e 10 segundos (extensão). A PCR foi realizada em 10 uL de mistura de reação constituída por 0,5µL de cDNA, 0,5 µM de cada iniciador específico do gene (Tabelas 1 e 2). A melhor temperatura para o emparelhamento foi de 57°C em *Stylosanthes guianensis* e 47°C em *Panicum maximum*.

Os produtos de PCR foram aplicados a um gel de agarose 2% (w/v) de tampão Tris-acetato contendo EDTA e gelredTM. Após a eletroforese, as bandas foram cortadas e o produto foi purificado com o kit de recuperação de DNA Zymoclean Gel TM e depois sequenciados (STAB-Vida, Oeiras, PT).

A PCR em tempo real foi realizada em 20 μ L de mistura de reação constituída por 1 μ L de cDNA 50 vezes diluído, 0,5 μ M de cada iniciador específico do gene e master mix iQ EVA Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA), de acordo com as recomendações do fabricante, usando o IQ5 RT-PCR (Bio-Rad, Hercules, CA). A amplificação dos produtos através da PCR foi monitorada pela intercalação de EVA Green (incluído no supermix). As condições de reação foram as seguintes: i) *Panicum*: ativação inicial da polimerase, 95°C por 2 minutos, em seguida, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação), 47°C por 30 segundos (emparelhamento) e 72°C por 30 segundos de extensão; ii) *Stylosanthes*: ativação inicial da polimerase, 95°C por 2 minutos, em seguida, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação), 57°C por 30 segundos (emparelhamento) e 72°C por 30 segundos (extensão).

A detecção dos produtos da PCR foi monitorada através da medição da fluorescência emitida pela ligação do EVA Green com o ds DNA (DNA de dupla fita) após cada ciclo de extensão. Cada determinação foi completada com uma análise da curva de dissociação (Melting) para confirmar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores. Os resultados foram analisados com o software do sistema óptico IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA), que calcula o ciclo de quantificação (Cq). Os produtos de PCR foram corridos em géis de agarose a 2% para se certificar de que havia um único fragmento amplificado do tamanho esperado.

Os PCRs com cada par de iniciadores foram também realizados em reações sem amostra, em triplicata (no template control). Para gerar um gráfico com uma linha de base subtraída do aumento logarítmico do sinal de fluorescência (ΔR_n) versus número do ciclo, os resultados da linha de base foram recolhidos entre os ciclos 5 e 17. Todos os gráficos de amplificação foram analisados com limite R_n de 0,10 em *Panicum* e de 0,15 em *Stylosanthes*, no início da região de amplificação exponencial. Os resultados de Cq (ciclo de quantificação) foram exportados para um programa Excel MS (Microsoft Inc .) para posterior análise. Os valores de Cq foram normalizados para o valor de Cq da actina (COITO et al., 2012), um gene *housekeeping* (gene de manutenção) que é expresso em níveis constantes nas condições testadas, usando o método $\Delta\Delta Cq$.

O método do $\Delta\Delta Cq$ foi utilizado para calcular os níveis de expressão dos genes de duas maneiras. Primeiramente, o nível de expressão de cada gene na parte aérea e raízes aos 14 e 28 dias (capim) e aos 28 dias (estilosante) de crescimento em limitação e suficiência de S foi calculado relativamente à sua expressão no dia zero do experimento (controle). Posteriormente, o nível de expressão de cada gene na parte aérea e raízes de ambas as

espécies crescidas sob limitação de S foi calculado relativamente à sua expressão em plantas crescidas em suficiência de S.

7.2.5 Análise estatística

Os resultados foram processados para se obter cada média e o respectivo erro padrão da média de quatro repetições ($n = 4$). Os efeitos do S foram determinados por análise de variância (ANOVA), por meio da comparação de médias (teste de Tukey), com o programa estatístico SAS versão 9.01 (SAS Institute Inc., Cary, EUA). A significância estatística foi analisada ao nível de 5%.

7.3 Resultados

7.3.1 Crescimento das plantas e estado nutricional em S

Na parte aérea do capim crescido em disponibilidade limitante de S a concentração de S total foi de $0,62 \text{ g kg}^{-1}$, sendo que, 94% desse S estava presente como S-sulfato. Nas plantas crescidas em disponibilidade suficiente de S a concentração de S total na parte aérea foi de $1,02 \text{ g kg}^{-1}$ e apenas 70% do S estava como S-sulfato. Acréscimos significativos nas concentrações de S total e S-sulfato também foram verificados nas raízes do capim, na condição de suficiência de S. As concentrações de S total e S-sulfato na parte aérea do capim foram semelhantes às das raízes tanto para a condição de limitação quanto de suficiência de S (Figuras 1A e 1B).

As concentrações de S total na parte aérea do estilosante crescido em disponibilidade limitante e suficiente de S foram $0,41$ e $2,00 \text{ g kg}^{-1}$, e destes, 80 e 58%, respectivamente, corresponderam à fração S-sulfato. As concentrações de S total e S-sulfato nas raízes do estilosante foram maiores do que as da parte aérea nas duas disponibilidades de S testadas, o que revela a tendência destas plantas em acumular mais S nas raízes do que na parte aérea (Figuras 1A e 1B).

A concentração de glutathiona na parte aérea do capim e do estilosante aumentou significativamente na presença da disponibilidade suficiente de S comparativamente à disponibilidade limitante de S. No entanto, nas raízes destas espécies a concentração de glutathiona foi superior nas plantas cultivadas em limitação de S quando comparada à suficiência de S (Figura 1C).

Figura 1- Concentração de enxofre total (A), enxofre-sulfato (B) e glutaciona (C) na parte aérea e raízes do capim-tanzânia e estilosante Mineirão crescidos em limitação e suficiência na disponibilidade de S. As barras são médias $\pm$ SE. As letras diferentes denotam as diferenças entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=4)

A massa seca total e da parte aérea do capim foram inferiores nas plantas crescidas sob limitação de S, enquanto que a massa seca das raízes não foi afetada pela limitação de S. Para o estilosante, a oferta limitante de S não afetou significativamente a massa seca total, da parte aérea e das raízes (Tabela 3).

Tabela 3- Massa seca total, na parte aérea e nas raízes do capim-tanzânia e estilosante Mineirão crescidos em limitante e suficiente disponibilidade de S

Oferta de S	Massa seca (g planta ⁻¹)					
	capim-tanzânia			estilosante Mineirão		
	Total	Parte aérea	Raízes	Total	Parte aérea	Raízes
Limitante	1,01 b±0,04	0,86 b±0,03	0,15 a±0,01	0,49 a±0,01	0,40 a±0,01	0,09a±0,01
Suficiente	1,12 a±0,03	0,96 a±0,03	0,16 a±0,02	0,53 a±0,02	0,46 a±0,02	0,07a±0,02

Os valores são médias ± SE. As letras diferentes denotam as diferenças entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=4)

7.3.2 Influência do estado nutricional em S das plantas na absorção de ³⁴S pelas raízes

A quantidade de ³⁴S derivado externamente, em cada espécie foi altamente dependente do estado nutricional das plantas em S. No capim-tanzânia, a mais alta taxa de influxo total de ³⁴S ocorreu nas plantas previamente crescidas em disponibilidade suficiente de S, que importaram cerca de 265 µg de ³⁴S g⁻¹ h⁻¹. A quantidade de ³⁴S absorvida e acumulada nas raízes do capim também foi maior nas plantas previamente crescidas em disponibilidade suficiente de S. A quantidade de ³⁴S na parte aérea do capim não foi influenciada pelo estado nutricional em S (Figura 2). As plantas de capim crescidas em nutrição limitante de S não apresentaram mudanças do percentual de distribuição do ³⁴S para a parte aérea comparativamente às plantas crescidas anteriormente em nutrição suficiente de S (Tabela 4).

O maior influxo total de ³⁴S ocorreu nas plantas de estilosante previamente crescidas em baixa nutrição de S, que importaram 170 µg de ³⁴S g⁻¹ h⁻¹. As raízes do estilosante crescido em nutrição limitante de S apresentaram maior quantidade de ³⁴S absorvida e acumulada comparativamente às plantas crescidas em nutrição suficiente de S. A quantidade de ³⁴S na parte aérea do estilosante crescido em disponibilidade limitante de S não diferiu das plantas plantas crescidas em condição de suficiência nutricional de S (Figura 2). No entanto, as plantas de estilosante crescidas em nutrição suficiente de S apresentaram maior percentual de distribuição do ³⁴S para a parte aérea em relação às plantas crescidas em limitação de S (Tabela 4).

Figura 2- Influxo total, na parte aérea e nas raízes de ^{34}S em plantas de capim-tanzânia e estilosante Mineirão crescidas previamente por 28 dias em limitante e suficiente disponibilidade de S. As barras são médias $\pm$ SE. As letras diferentes denotam as diferenças entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey, $p \leq 0,05$; (n=4).

A distribuição de S-sulfato, glutatona e ^{34}S entre a parte aérea e raízes nas duas espécies foi influenciada pela nutrição de S de modo diferenciado (Tabela 4). As plantas de capim crescidas em limitação de S apresentaram maior distribuição de glutatona nas raízes, enquanto que a distribuição de S-sulfato e ^{34}S na parte aérea e nas raízes do capim não foi alterada pela limitação de S, quando comparada à suficiência de S. Por outro lado, as plantas de estilosante apresentaram menor distribuição de S-sulfato, glutatona e ^{34}S na parte aérea e maior distribuição de glutatona para as raízes em plantas crescidas em limitação de S, quando comparadas a suficiência de S (Tabela 4).

Tabela 4- Percentual da distribuição do S-sulfato (S-SO_4^{2-}), glutatona e ^{34}S nas plantas de capim-tanzânia e estilosante Mineirão crescidas em limitação e suficiência de S

Distribuição na planta (%)						
Capim-tanzânia						
Oferta de S	S-SO ₄ ²⁻		Glutaciona		³⁴ S	
	P.A.	Raiz	P.A.	Raiz	P.A.	Raiz
Limitante	46Ba	54Aa	73Ab	27Ba	24Ba	76Aa
Suficiente	46Ba	54Aa	98Aa	2Bb	22Ba	78Aa
Estilosante Mineirão						
Oferta de S	S-SO ₄ ²⁻		Glutaciona		³⁴ S	
	P.A.	Raiz	P.A.	Raiz	P.A.	Raiz
Limitante	29Bb	71Aa	33Bb	67Aa	8Bb	92Aa
Suficiente	35Ba	65Ab	58Aa	42Bb	14Ba	86Ab

Resultados são médias $\pm$ SE, de quatro repetições. Os valores médios de cada variável seguida por letras maiúsculas são diferentes na linha (parte da planta) e por letras minúsculas são diferentes na coluna (oferta de S) de acordo como teste de Tukey ($P < 0,05$).

A resposta do influxo total de ^{34}S à limitação de S variou de acordo com a espécie vegetal, sendo o fator preponderante provavelmente a exigência nutricional relacionada ao elemento (Figura 2). No capim-tanzânia, o influxo total de ^{34}S foi positivamente correlacionado com a concentração de S total e S-sulfato na parte aérea e raízes e, negativamente correlacionado com a concentração de glutatona nas raízes (Tabela 5). No estilosante, o influxo total de ^{34}S foi negativamente correlacionado com as concentrações de S total, S-sulfato e glutatona na parte aérea. Entretanto, nas raízes somente as concentrações de S total e S-sulfato se correlacionaram negativamente com a taxa de influxo total de ^{34}S . A concentração de glutatona nas raízes do estilosante foi positivamente correlacionada com o influxo de ^{34}S total.

Tabela 5- Coeficientes de correlação entre parâmetros do estado nutricional em S e o influxo de ^{34}S em plantas de capim-tanzânia e estilosante Mineirão aos 28 dias de crescimento

Influxo total ^{34}S ($\mu\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Estado nutricional em enxofre					
	Parte aérea			Raízes		
	S total (g kg^{-1})	S-SO ₄ ²⁻ (mg kg^{-1})	Glutaciona (nmol g^{-1})	S total (g kg^{-1})	S-SO ₄ ²⁻ (mg kg^{-1})	Glutaciona (nmol g^{-1})
<i>P. maximum</i>	0,85 **	0,84 **	0,41 ^{ns}	0,85 **	0,85 **	-0,69 *
<i>S. guianensis</i>	-0,86 *	-0,87 *	-0,78 *	-0,86 *	-0,87 *	0,83 *

*P<0,05. **P<0,01. Ns- não significativo

7.3.3 Influência do estado nutricional em S das plantas na expressão de transportadores de sulfato nas folhas e raízes

A transcrição dos genes que codificam transportadores de sulfato nas folhas e nas raízes do capim foram monitoradas tanto em condições de limitação de S quanto de suficiência de S e nas duas épocas avaliadas (14 e 28 dias de crescimento). Porém, o maior aumento de expressão dos transportadores de sulfato em relação ao dia zero (controle) ocorreu nas folhas do capim crescido em suficiência de S tanto aos 14 quanto aos 28 dias. Após 14 dias de crescimento em suficiência de S, a expressão relativa do STB1.a aumentou e as expressões de ST2.1, ST3.3, ST3.4 e ST3.5 diminuíram nas folhas do capim em relação ao controle. Após 28 dias de crescimento em suficiência de S, nas folhas do capim ocorreu o aumento na expressão relativa de todos os transportadores de sulfato avaliados nesse estudo (Figura 3).

Nas raízes do capim crescido em limitação ou suficiência de S, a expressão relativa dos transportadores de sulfato não foi tão fortemente alterada em relação ao controle quanto nas folhas. No entanto, foi verificado um pequeno acréscimo na expressão dos transportadores

de sulfato aos 28 dias nas raízes crescidas sob limitação de S e, decréscimo na expressão do STB1 e ST3.4 nas raízes crescidas sob suficiência de S, relativamente ao dia zero (Figura 3).

Figura 3- Expressão relativa dos transportadores de sulfato STB1.a, ST2.1, ST3.2, ST3.3, ST3.4, ST3.5 nas folhas e raízes do capim crescido em condições de limitação e suficiência de S aos 14 e 28 dias, em relação ao dia zero

Nas folhas e raízes do capim crescido em limitação de S ocorreu o aumento de expressão do transportador ST3.4, tanto aos 14 quanto aos 28 dias de crescimento. Nas raízes do capim crescido por 28 dias em limitação de S todos os transportadores de sulfato avaliados tiveram sua expressão aumentada em relação à condição de suficiência. Por sua vez, nas folhas somente o ST3.4 permaneceu mais expresso e os demais tiveram sua transcrição reprimida pela limitação de S (Figura 4).

Figura 4- Expressão relativa dos transportadores de sulfato STB1.a, ST2.1, ST3.2, ST3.3, ST3.4, ST3.5 nas folhas e raízes, aos 14 e 28 dias do capim crescido em limitação de S em relação a suficiência de S

O transportador de sulfato ST2 aumentou consideravelmente sua expressão nas folhas e raízes do estilosante crescido por 28 dias em suficiência de S, relativamente ao dia zero. Os

transportadores STRL e STLA também apresentaram aumento da expressão nas folhas crescidas em suficiência de S aos 28 dias relativamente ao dia zero (Figura 5). No estilante crescido por 28 dias sob limitação de S ocorreu forte repressão dos transportadores ST2, ST4, STLA e HAST nas folhas e principalmente o ST1 e o STRL nas raízes, em relação ao dia zero.

Figura 5- Expressão relativa dos transportadores de sulfato ST1, ST2, ST4, STRL, STLA e HAST nas folhas e raízes do estilante crescido em condições de limitação e suficiência de S aos 28 dias, em relação ao dia zero

A limitação de S para o estilante ocasionou a diminuição da expressão dos transportadores de sulfato nas folhas e nas raízes relativamente à condição de suficiência de S. O transportador ST2 foi o mais fortemente reprimido pela limitação de S tanto nas folhas quanto nas raízes do estilante. O STRL também foi fortemente reprimido nas folhas em condição de limitação de S (Figura 6).

Figura 6- Expressão relativa dos transportadores de sulfato ST1, ST2, ST4, STRL, STLA e HAST nas folhas e raízes aos 28 dias do estilante crescido em limitação de S em relação à suficiência de S

7.4 Discussões

A plasticidade fisiológica para aumentar ou diminuir a capacidade de absorção de S, de acordo com a prévia suficiência ou limitação do nutriente, é atribuída à regulação dos transportadores de sulfato na membrana plasmática das raízes das plantas (MARUYAMA-NAKASHITA et al., 2004). Além disso, a resposta das plantas é dependente da espécie vegetal, sendo o fator preponderante a exigência nutricional relacionada ao elemento. De acordo com Hawkesford e De Kok (2006), as respostas iniciais hipotéticas das plantas à limitação da disponibilidade de S envolvem a otimização da absorção e da utilização do sulfato, acompanhado do aumento na remobilização de reservas inorgânicas e orgânicas de S nos tecidos vegetativos e posterior redistribuição em direção aos tecidos em crescimento.

No caso da limitação nutricional de S estabelecida para as duas espécies forrageiras (0,10 mmol L⁻¹ de S), o presente estudo mostrou que a limitação de S aplicada durante 28 dias não teve efeito significativo na produção de massa seca das raízes. A produção de massa seca total e da parte aérea da leguminosa forrageira (estilosante) também não foram significativamente prejudicadas pela limitação de S. Entretanto, a produção de massa seca total e da parte aérea da gramínea forrageira (capim-tanzânia) foram reduzidas pela limitação de S (Tabela 1). Embora, a limitação de S para o estilosante não tenha prejudicado a produção de massa seca, o estado nutricional em S do estilosante foi mais afetado pela limitação de S comparativamente ao capim, principalmente no que se refere às reduções verificadas nas concentrações de S total e S-sulfato (Figura 1).

A concentração de glutathione aumentou consideravelmente nas raízes de ambas as espécies em condição de limitação de S (Figura 1C). A partir de estudos realizados com plantas herbáceas foi verificado que a glutathione é sinalizadora da demanda de S podendo ser transportada via floema da parte aérea para as raízes e podendo regular a absorção de sulfato e o carregamento no xilema (RENNENBERG, 1995; LAPPARTIENT; TOURAINÉ, 1996). Estudos realizados por Herschbach et al. (2000) mostraram que, sob condições de limitação de S para as plantas, o aumento do transporte de glutathione no floema reduz o carregamento de sulfato no xilema.

Como descrito previamente por Herschbach e Rennenberg (2001), o estado nutricional em S das plantas pode regular a demanda de S ao nível da absorção de sulfato e o carregamento no xilema. As concentrações de S total e S-sulfato nas folhas e raízes do capim influenciaram positivamente o influxo total de ³⁴S. Por outro lado, a concentração de glutathione nas raízes do capim influenciou negativamente o influxo total de ³⁴S (Tabela 5).

Desse modo, a limitação de S para o capim resultou em aumento da concentração de glutathione nas raízes e promoveu menor influxo total de ^{34}S . A limitação de S aumentou a expressão relativa dos transportadores de sulfato nas raízes, comparativamente à condição de suficiência de S. No entanto, a expressão dos transportadores de sulfato nas folhas do capim crescido em limitação de S foi reduzida (com exceção do ST3.4), mas essa redução não afetou o carregamento de ^{34}S no xilema visando o transporte para as folhas, pois as plantas com limitação de S apresentaram percentual de distribuição de ^{34}S na parte aérea semelhante ao das plantas crescidas em suficiência de S (Tabela 4).

Em resumo, a menor concentração de glutathione na parte aérea, bem como a diminuição dos níveis de transcrição de STB1.a, ST2.1, ST3.2, ST3.3, ST3.5 nas folhas do capim aos 28 dias e os aumentos na concentração de glutathione e na expressão dos transportadores de sulfato nas raízes foram identificadas como as respostas específicas do capim para a limitação do S (Figuras 2C e 4).

A elevada expressão do STB1.a nas folhas do capim após 28 dias de crescimento em condição de suficiência de S pode estar relacionada ao aumento da demanda de S pelas plantas, devido ao intenso crescimento vegetativo da parte aérea, que pode ter ocasionado também o maior influxo total de ^{34}S nessas plantas em relação às plantas crescidas em condição de limitação de S (Figura 2). Desse modo, para o capim é pressuposto que a produção de biomassa relativamente mais rápida na parte aérea das plantas crescidas em suficiência de S pode estar associada à maior absorção de sulfato e principalmente à maior absorção do sistema de alta afinidade (STB1.a).

No estíloso, as mais baixas concentrações de sulfato e S total nas raízes e na parte aérea das plantas parecem controlar o influxo de ^{34}S na planta em condição de limitação de S de modo a suprir a demanda nutricional em S pelas plantas. Por outro lado, as plantas de estíloso crescidas em limitação de S apresentaram mais alta concentração e distribuição de glutathione nas raízes (Tabela 5). Dessa forma, as altas concentrações de glutathione nas raízes do estíloso não ocasionaram a redução da absorção de sulfato, contrariando o pressuposto de que a glutathione controla a demanda de S da planta e a absorção de sulfato nessa espécie. No entanto, a expressão relativa dos transportadores de sulfato nas raízes e principalmente nas folhas do estíloso foi altamente reprimida pela limitação de S (Figura 5).

O controle *feedback* da expressão dos transportadores pode ser realizado tanto pelo sulfato (CRAM, 1983) quanto pelos produtos da via da assimilação do sulfato (HERSCHBACH; RENNENBERG, 2001). Nos estudos recentes que têm centralizado o enfoque na expressão dos transportadores de sulfato e sua regulação, o sulfato e compostos de

S reduzido são discutidos como os sinais envolvidos na repressão da transcrição dos transportadores de sulfato (TAKAHASHI et al., 1997;. BOLCHI et al., 1999;. LAPPARTIENT et al., 1999) .

Embora as plantas de estilante crescidas sob limitação de S tenham apresentado maior influxo total de ^{34}S , o transporte de ^{34}S até as folhas foi prejudicado pela limitação de S, o que pode ser verificado pelo menor percentual de distribuição desse nutriente nas folhas, comparativamente à condição de suficiência de S. A redução na expressão dos transportadores de sulfato nas folhas pode ter sido ocasionada pela alta concentração de glutathione nas raízes do estilante e, desse modo, pode também ter reduzido o transporte de ^{34}S para as folhas. De acordo com resultados publicados anteriormente por Herschbach e Rennenberg (1991 e 1994), Herschbach, De Kok e Rennenberg (1995a, b) e Lappartient e Touraine (1996) a glutathione pode reduzir o carregamento de sulfato no xilema de plantas herbáceas.

As plantas de estilante crescidas em suficiência de S distribuíram melhor o S para as folhas pois maiores quantidades de sulfato, glutathione e ^{34}S foram verificadas na parte aérea das plantas crescidas em suficiência de S, em relação às plantas com limitação de S. Esse acréscimo observado na distribuição de ^{34}S para a parte aérea em plantas melhor nutridas em S pode estar associado ao aumento da expressão dos transportadores de STLA e ST2 nas folhas aos 28 dias. O aumento na expressão de ST2 nas folhas e raízes e de STLA nas folhas do estilante crescido em condição de suficiência de S também é um indicativo do aumento na remobilização de sulfato a partir do estoque de sulfato contido no vacúolo.

7.5 Conclusões

A absorção de sulfato e a expressão relativa dos transportadores foram reguladas de forma diferenciada no capim e no estilante. No capim, a maior produção de biomassa na parte aérea das plantas crescidas em suficiência de S parece estar associada à maior absorção de ^{34}S e principalmente à maior expressão do sistema de transporte de alta afinidade. O aumento da concentração de glutathione nas raízes e o menor influxo total de ^{34}S ocorreram no capim com limitação em S. A limitação de S para o capim aumentou a expressão relativa dos transportadores de sulfato nas raízes e diminuiu nas folhas, comparativamente à condição de suficiência de S.

No estilante, as mais baixas concentrações de sulfato e S total nas raízes e na parte aérea das plantas parecem controlar o influxo de ^{34}S na planta em condição de limitação de S de modo a suprir a demanda nutricional em S pelas plantas. As altas concentrações de glutathione nas raízes do estilante não ocasionaram a redução da absorção de sulfato. A

expressão relativa dos transportadores de sulfato nas raízes e principalmente nas folhas do estilósante foi altamente reprimida pela limitação de S.

Referências

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, New York, v.113, p.548–555, 1985.

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.C.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, S. Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. **Tropical Plant Biology**, New York, v.2, p.38–50, 2009.

BENDASSOLLI, J.A.; TRIVELIN, P.C.O.; CARNEIRO JUNIOR, F.C. Stable sulfur isotope fractionation by anion exchange chromatography production of compounds enriched in ^{34}S . **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.8, p.13-17, 1997.

BOLCHI, A.; PETRUCCO, S.; TENCA, P.L.; FORONI, C.; OTTONELLO, S. Coordinate modulation of maize sulphate permease and ATP sulphurylase mRNAs in response to variations in sulphur nutritional status: Stereospecific down regulation by L-cysteine. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.39, p.527–537, 1999.

BONAS, U.; SCHMITZ, K.; RENNENBERG, H.; BERGMANN, L. Phloem transport of sulphur in *Ricinus*. **Planta**, New York, v.155, p.82–88, 1982.

BRUNOLD, C. Regulatory interactions between sulphate and nitrate assimilation. In: DE KOK, L.J.; STULEN, I.; RENNENBERG, H.; BRUNOLD, C.; RAUSER, W. E. (Ed.). **Sulphur Nutrition and Assimilation in Higher Plants**. The Hague: SPB Academic Publishing, 1993. p. 61-75.

COITO, J.; ROCHETA, R.; CARVALHO, L.C.; AMÂNCIO, S. Microarray-based uncovering reference genes for quantitative real time PCR in grapevine under abiotic stress. **BMC Research Notes**, London, (in print), 2012.

CRAM, W.J. Sulphate accumulation is regulated at the tonoplast. **Plant Science Letters**, Clare, v.31, p.329–338, 1983.

FARAGO, S.; BRUNOLD, C. Regulation of assimilatory sulfate reduction by herbicide safeners in *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, p.1808-1812, 1990.

HAWKESFORD, M.J. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S utilisation efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.131-138, 2000.

HAWKESFORD, M.J.; DE KOK, L.J. Managing sulphur metabolism in plants. **Plant Cell and Environment**, Malden, v.29, p.382-395, 2006.

HERSCHBACH, C.; RENNENBERG, H. Influence of glutathione (GSH) on sulphate influx, xylem loading and exudation in excised tobacco roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, p.1021-1029, 1991.

_____. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p.1069-1076, 1994.

_____. Significance of phloem translocated organic sulphur compounds for the regulation of sulphur nutrition. **Progress in Botany**, Heidelberg, v.62, p.177-193, 2001.

HERSCHBACH, C.; DE KOK, L.J.; RENNENBERG, H. Net uptake of sulphate and its transport to the shoot in spinach plants fumigated with H₂S or SO₂: Does atmospheric sulphur affect the 'interorgan' regulation of sulphur nutrition. **Botanica Acta**, Stuttgart, v.108, p.41-46, 1995a.

_____. Net uptake of sulphate and its transport to the shoot in tobacco plants fumigated with H₂S or SO₂. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.175, p.75-84, 1995b.

HERSCHBACH, C.; VAN DER ZALM, E.; SCHNEIDER, A.; JOUANIN, L.; DE KOK, L. RENNENBERG, H. Regulation of sulfur nutrition in wildtype and transgenic poplar over-expressing γ -glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H₂S. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.461-473, 2000.

JOHNSON, C.M.; NISHITA, H. Micro-estimation of sulphur in plant materials, soils and irrigation waters. **Analytical Chemistry**, Washington, v.24, p.736-742, 1952.

KOCSY, G.; BRUNNER, M.; RÜEGSEGG, A.; STAMP, P.; BRUNOLD, C. Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. **Planta**, New York, v.198, p.365-370, 1996.

KOPRIVA, S. Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. **Annals of Botany**, London, v.97, p.479-495, 2006.

KOPRIVA, S.; WIEDEMANN, G.; RESKI, R. Sulfate assimilation in basal land plants. What does genomic sequencing tell us? **Plant Biology**, Malden, v.9, p.556-564, 2007.

LAPPARTIENT, A.G.; TOURAINÉ, B. Demand-driven control of root ATP sulphurylase activity and SO₄²⁻ uptake in intact canola. The role of phloem-translocated glutathione. **Plant Physiology**, Rockville, v.111, p.147-157, 1996.

LAPPARTIENT, A.G.; VIDMAR, J.J.; LEUSTEK, T.; GLASS, A.D.M. TOURAINÉ, B. Inter-organ signalling in plants: Regulation of ATP sulphurylase and sulphate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. **Plant Journal**, Malden, v.18, p.89-95, 1999.

MARUYAMA-NAKASHITA, A.; NAKAMURA, Y.; YAMAYA, T.; TAKAHASHI, H. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1843-1849, 2004.

RENNENBERG, H. Processes involved in glutathione metabolism. In: WALLSGROVE, R.M. (Ed.). **Amino Acids and their Derivatives in Higher Plants – Biosynthesis and Metabolism**. Cambridge: Cambridge University, 1995. p.155-171.

ROUACHED, H.; WIRTZ, M.; ALARY, R.; HELL, R.; ARPAT, A.B.; DAVIDIAN, J.; FOURCROY, P.; BERTHOMIEU, P. Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.147, p.897-911, 2008.

SAS Institute Inc., **SAS OnlineDoc® 9.1.2**. Cary, NC: SAS Institute Inc. JMP Statistics and Graphics Guide, version 5. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.

SINCLAIR, A. An autoanalyzer method for determination of extractable sulphate in plant material. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.40, p.693-697, 1974.

SMITH, I.K.; KENDALL, A.C.; KEYS, A.J.; TURNER, J.C.; LEA, P.J. The regulation of the biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) **Plant Science**, Clare, v.41, p.11-17, 1985.

SMITH, F.W.; EALING, P.M.; HAWKESFORD, M.J.; CLARKSON, D.T. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, p. 9373-9377, 1995.

TABATABAI, M.A. Sulfur. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Eds.) **Methods of soil analysis**. Part 2. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.501-538.

TAKAHASHI, H.; YAMAZAKI, M.; SASAKURA, N.; WATANABE, A.; LEUSTEK, T.; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; ENGLER, G.; VAN MONTAGU, M.; SAITO, K. Regulation of cysteine biosynthesis in higher plants: A sulphate transporter induced in sulphate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.94, p.11102-11107, 1997.

VIDMAR, J.J.; TAGMOUNT, A.; CATHALA, N.; TOURAIN, B.; DAVIDIAN, J.C. Cloning and characterisation of a root specific high-affinity sulphate transporter from *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Heidelberg, p.475, p.65-69, 2000.

WESTERMAN, S.; DE KOK, L.J.; STUIVER, E.E.; STULEN, I. Interaction between metabolism of atmospheric H₂S in the shoot and sulphate uptake by the roots of curly kale (*Brassica oleracea*). **Physiology Plantarum**, Malden, v.109, p.443, 2001.

8 CONCLUSÕES GERAIS

O suprimento de S para as plantas influi diretamente na emissão de folhas e de perfilhos, área foliar, comprimento e superfície radicular do capim-tanzânia e do estilosante, aumentando a produção de massa seca da parte aérea e das raízes. A limitação nutricional de S altera a distribuição de fotossintatos entre a parte aérea e as raízes das plantas de capim-tanzânia e estilosante, proporcionando maior produção de massa seca das raízes em relação à parte aérea. As plantas de capim-tanzânia aumentam a superfície radicular como mecanismo de adaptação à limitação no fornecimento de S no meio de cultivo. O IRC das folhas recém-expandidas se relaciona com a produção de massa seca da parte aérea, podendo ser utilizado para avaliar o estado nutricional em S nas duas espécies forrageiras. Para garantir alta produção de forragem aliada ao melhor valor nutricional da forragem quanto às concentrações de S, pode-se sugerir a utilização da mistura do capim com a leguminosa em consórcio na pastagem.

A baixa disponibilidade de S ocasiona o desequilíbrio nutricional do N nas plantas de capim-tanzânia e estilosante, manifestado por alta relação N:S e altas concentrações de N-nitrato e aminoácidos livres no tecido vegetal. Sob limitação de S, as plantas de capim-tanzânia apresentam predomínio de asparagina na composição aminoacídica, enquanto no estilosante ocorre a predominância de arginina. O fornecimento balanceado de S proporciona relação N:S em valores próximos a 20:1.

A aplicação de S promove o incremento das concentrações de S total, S-sulfato e glutathiona total nas folhas diagnósticas e raízes de ambas as espécies forrageiras, tanto na fase de crescimento inicial quanto na rebrotação das plantas. Sob limitação no suprimento de S o capim e a leguminosa apresentaram alta atividade da enzima GR no sentido de regenerar a GSH, que atua protegendo as células contra danos oxidativos decorrentes do estresse da deficiência nutricional do S. O fornecimento de S aumenta a atividade da GST, o que resulta em mais elevada capacidade do vegetal de suportar estresses ambientais.

A limitação de S induz a atividade de enzimas antioxidantes que atuam na regeneração do AsA, visando combater o estresse oxidativo. Também, as plantas crescidas sob baixa disponibilidade de S apresentam aumento da síntese de glutathiona e translocação da glutathiona para as raízes, como resposta ao estresse oxidativo.

A absorção de sulfato e a expressão relativa dos transportadores foram reguladas de forma diferenciada no capim e no estilosante. No capim a maior produção de biomassa na parte aérea das plantas crescidas em suficiência de S parece estar associada com a maior

absorção de ^{34}S e principalmente com a maior expressão do sistema de transporte de alta afinidade. O aumento da concentração de glutathione nas raízes e o menor influxo total de ^{34}S foram identificados como respostas específicas do capim para a limitação do S. A limitação de S para o capim também aumentou a expressão relativa dos transportadores de sulfato nas raízes e diminuiu a expressão destes nas folhas comparativamente à condição de suficiência de S. No estilosante, as mais baixas concentrações de sulfato e S total nas raízes e na parte aérea das plantas parecem controlar o influxo de ^{34}S na planta em condição de limitação de S para suprir a demanda nutricional em S pelas plantas. As altas concentrações de glutathione nas raízes do estilosante não ocasionam a redução da absorção de sulfato. A expressão relativa dos transportadores de sulfato nas raízes e principalmente nas folhas do estilosante foi severamente reprimida pela limitação de S.