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

**Doses e formas de nitrogênio na nutrição, produção e estresse
oxidativo do capim tanzânia**

Ana Carolina Dezuó Correr

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2015**

**Ana Carolina Dezuó Correr
Engenheira Agrônoma**

**Doses e formas de nitrogênio na nutrição, produção e estresse oxidativo do
capim tanzânia**

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2015**

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

Correr, Ana Carolina Dezuó

Doses e formas de nitrogênio na nutrição, produção e estresse oxidativo do capim
tanzânia / Ana Carolina Dezuó Correr. - - Piracicaba, 2015.
93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Panicum maximum* 2. Amônio 3. Glutamina sintetase 4. Espécies reativas do oxigênio
5. Nitrato 6. Redutase do nitrato 7. Sistema antioxidante I. Título

CDD 633.2
C824d

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

DEDICATÓRIA

*Aos meus amores, meus pais, Maria e Aparecido
Aos meus irmãos Marcelo, Paulo, Robson, Renato e Angélica,
Meus sobrinhos, em especial meu afilhado Arthur Henrique,
Ao meu melhor amigo e também namorado Renato Schiavuzzo,
Pelo amor, carinho, compreensão e incentivo,
OFEREÇO E DEDICO*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre iluminar meu caminho, guiar meus passos, dar-me forças em todas as etapas de minha jornada e principalmente por fazer-me enxergar o lado bom da vida em todos os momentos,

A Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e Departamento de Ciência do Solo pela oportunidade concedida,

Ao meu orientador, professor Dr. Francisco Antonio Monteiro, por ter acreditado em minha capacidade profissional, e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos ao longo do mestrado,

Às funcionárias do Laboratório de Análises de Tecidos Vegetais: Edinéia Cristina Scervino Mondoni, Lúcia Helena Spessotto Pavan Forti, Lurdes Aparecida Dário de Gonzalez e Nivanda Maria de Moura Ruiz e do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas Dr^a. Salete Aparecida Gaziola, pela ajuda dispensada,

Aos meus amigos e colegas da pós graduação na ESALQ-USP por toda ajuda e companheirismo: Janine Gonçalves, Arnon Cardoso, Renata Lupp, Thales Satolo, Greice Leal, Flávio Henrique Rabêlo, Leila Peters, Beatriz Nastaro e Roberta Nogueiro,

Em especial às minhas amigas e companheiras de pós graduação, que levarei por toda a vida: Bruna Arruda e Ioná Rech que me ajudaram e motivaram em todas as etapas do projeto, e que deixaram a vida mais leve,

Aos meus amigos da vida: Renato Schiavuzzo, Wellington Bendinelli, Marina Mengardo, Juliana Jabur, Letícia Sarto e Carolina Vaccari, por estarem sempre dispostos a me ouvir e por me mostrarem luz quando sozinha já não conseguia ver,

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

EPÍGRAFE

*“Crê em ti mesmo, age e verá os resultados.
Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar”.
Chico Xavier*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Caracterização das pastagens brasileiras e do capim tanzânia.....	17
2.2 Nitrogênio e sua importância para plantas forrageiras	18
2.3 Metabolismo do nitrato e amônio	21
2.4 Estresse oxidativo	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Local e época	25
3.2 Delineamento experimental.....	25
3.3 Soluções nutritivas	25
3.4 Instalação e condução do experimento	26
3.5 Coleta do material vegetal.....	27
3.6 Avaliações morfogênicas e estado nutricional em nitrogênio	28
3.6.1 Número de folhas e perfilhos.....	28
3.6.2 Emissão de folhas e perfilhos.....	28
3.6.3 Determinação da área foliar	28
3.6.4 Determinação da produção de massa seca	28
3.6.5 Concentração relativa de clorofila (valor SPAD)	28
3.6.6 Determinações de nitrogênio total, nitrato e amônio nos tecidos vegetais	29
3.6.7 Avaliações nas raízes.....	29
3.7 Avaliações metabólicas	29
3.7.1 Enzimas de incorporação de nitrogênio	29
3.7.1.1 Atividade da redutase do nitrato (RN)	29
3.7.1.2 Atividade da glutamina sintetase (GS)	30
3.7.2 Estresse oxidativo	31
3.7.2.1 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio	31
3.7.2.2 Extração proteica	31
3.7.2.3 Determinação de proteínas	32
3.7.3 Enzimas do sistema antioxidativo	32
3.7.3.1 Atividade da catalase (CAT).....	32

3.7.3.2 Atividade da glutathione redutase (GR)	32
3.7.3.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida em sistema não desnaturante.....	33
3.8 Análise estatística	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Avaliações morfogênicas	35
4.1.1 Número de folhas e perfilhos	35
4.1.2 Emissão de perfilhos e folhas	37
4.1.3 Área foliar	40
4.1.4 Produção de massa seca	42
4.2 Estado nutricional em nitrogênio.....	46
4.2.1 Valor SPAD.....	46
4.2.2 Concentração de nitrogênio total	48
4.2.2.1 Folhas diagnósticas	48
4.2.2.2 Demais partes (DP)	50
4.2.3 Concentração de nitrato e amônio nos tecidos vegetais.....	54
4.3 Enzimas incorporadoras de nitrogênio.....	57
4.3.1 Atividade da redutase do nitrato	57
4.3.2 Atividade da glutamina sintetase	58
4.4 Estresse oxidativo.....	60
4.4.1 Indicadores de estresse.....	60
4.4.1.1 Malondialdeído (MDA)	60
4.4.1.2 Peróxido de hidrogênio	63
4.5 Sistema antioxidante.....	64
4.5.1 Atividade da catalase (CAT)	64
4.5.2 Atividade da glutathione redutase (GR).....	68
4.5.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida em sistema não desnaturante	70
5 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS	81

RESUMO

Doses e formas de nitrogênio na nutrição, produção e estresse oxidativo do capim tanzânia

O nitrogênio é um dos nutrientes que mais altera a produtividade das plantas forrageiras e as formas de fornecimento desse nutriente podem alterar as respostas das plantas. Objetivou-se avaliar as alterações morfogênicas, nutricionais, metabólicas e produtivas do capim tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia), em função do fornecimento de doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com emprego de substrato inerte e avaliando três doses de nitrogênio para fornecer nutrição baixa, intermediária e alta em nitrogênio (3, 15 e 27 mmol L^{-1}) e três proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ não fornecendo e até suprimindo amônio em relativo excesso (100/0, 70/30 e 40/60). As plantas foram submetidas a dois cortes da parte aérea e as raízes foram coletadas após o segundo corte. Foram avaliados o número de folhas e perfilhos, taxas de aparecimento de folhas e perfilhos, área foliar, produção de massa seca de parte aérea e de raízes, concentrações de nitrogênio total, NO_3^- e NH_4^+ nos tecidos vegetais, valor SPAD, concentrações de malondealdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio e atividades das enzimas redutase do nitrato, glutamina sintetase, catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase. A baixa dose de nitrogênio comprometeu a área foliar e produção de massa seca em ambos os crescimentos do capim tanzânia. O excesso de amônio na solução nutritiva também foi responsável pela área foliar e menor massa de parte aérea e de raízes. Elevadas concentração de MDA e peróxido foram encontrados nos componentes da parte aérea de plantas crescidas sob doses de nitrogênio com proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60, indicando estresse oxidativo nessas plantas. O estresse ocasionado pelo fornecimento exclusivo da forma nítrica ou pelo excesso de amônio resultou na indução de uma nova banda de SOD no sistema radicular do capim tanzânia, o que sugere que essa enzima tenha sido mais responsiva na eliminação de EROs no sistema radicular.

Palavras-chave: *Panicum maximum*; Amônio; Glutamina sintetase; Espécies reativas do oxigênio; Nitrato; Redutase do nitrato; Sistema antioxidante

ABSTRACT

Nitrogen rates and forms for tanzânia guineagrass nutrition, production and oxidative stress

Nitrogen is one of the nutrients that most improve forage grass productivity and the forms of this nutrient supply may affect plant responses. The objectives were to evaluate morphogenic, nutritional, metabolic and productive changes in tanzânia guineagrass (*Panicum maximum* cv. Tanzânia), as related to the supply of nitrogen rates and $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ proportions in the nutrient solution. The experiment was carried out in a greenhouse, by an inert substrate and testing three nitrogen rates to supply low, intermediate and high nitrogen nutrition and three $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ proportions (100/0, 70/30, 40/60) to have no ammonium up to relative excess ammonium. Plants had shoots harvested two times and roots were collected after the second harvest. Plant evaluations included number of leaves and tillers, leaf and tiller appearance rates, leaf area, shoots and roots dry matter production, plant tissue concentrations of total nitrogen, nitrate and ammonium, SPAD value, concentrations of malondialdehyde and hydrogen peroxide, and activities of the enzymes nitrate reductase, glutamine synthase, catalase, superoxide dismutase and glutathione reductase. Low nitrogen dose damaged the leaf area and dry matter production in both growths of tanzânia grass. The excess of ammonium in the nutrient solution was also responsible for leaf area and lower mass of shoots and roots. High concentration of MDA and peroxide were found in the shoot components of grown plants under nitrogen levels ratio of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 40/60, indicating oxidative stress in these plants. The stress caused by the exclusive supply of the ammonium nitrate form, or excess of ammonium resulted in the induction of a new band of SOD on the root system of the tanzânia guineagrass, suggesting that this enzyme has been more responsive in the elimination of ROS in the root system.

Keywords: *Panicum maximum*; Ammonium; Glutamine synthase; Reactive oxygen species; Nitrate; Nitrate reductase; Antioxidative system

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 180 milhões de hectares, que correspondem à metade dos utilizados nos estabelecimentos com agropecuária, matas e florestas e ao dobro das áreas ocupadas pelas lavouras no Brasil, são ocupados por pastagens. Essas pastagens alimentam, em média, 200 milhões de cabeças de bovinos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006), demonstrando a importância desses ambientes nas áreas produtiva e econômica do país.

No Brasil, as pastagens são compostas por ampla variedade de gêneros de plantas e dentre eles, está o *Panicum*. A principal espécie cultivada desse gênero é o *Panicum maximum*, com diversos cultivares, e entre eles está o capim tanzânia, lançado comercialmente pela Embrapa-Gado de Corte em 1990 (SAVIDAN et al., 1990). Esse capim é utilizado pelos produtores devido ao seu elevado potencial produtivo, alto valor nutritivo, boa resposta à adubação, resistência moderada à cigarrinha das pastagens e alta relação folha:colmo, mas exigente em fertilidade do solo (MACHADO et al., 1998). Para atender a exigência nutricional desse capim, é necessário fornecer nutrientes via fertilizantes, uma vez que a maior parte dos solos brasileiros não atende naturalmente a demanda dessas plantas.

Dessa forma, é de extrema importância conhecer a resposta produtiva da planta forrageira, assim como entender o que ocorre no metabolismo dessa planta quando é submetida à condição de estresse nutricional, tanto pela carência de nutrientes quanto pela presença em excesso de algum elemento químico no ambiente de cultivo (GASTAL; LEMAIRE, 2002).

Sabe-se que as gramíneas forrageiras respondem vigorosamente ao fornecimento de nitrogênio (N), o qual é absorvido pelas plantas, essencialmente, pelas raízes e, principalmente, como nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). O NH_4^+ é assimilado pelas plantas na forma em que é absorvido, enquanto o NO_3^- necessita de redução até NH_4^+ , mediante atuação das enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito. Quando absorvido em excesso, o NO_3^- tende a acumular-se no vacúolo celular para posterior utilização, enquanto o NH_4^+ pode resultar em intoxicação da planta.

Estudos recentes demonstram efeitos benéficos do fornecimento conjunto de NO_3^- e NH_4^+ para a produção de plantas forrageiras (BASTOS, 2012; MEGDA, 2013; SANTOS; DE BONA; MONTEIRO, 2013). Quando a dose de nitrogênio na forma de

NH_4^+ é fornecida para a planta forrageira em maior quantidade do que NO_3^- resulta em menor produção do capim, nos estudos em que a dose de nitrogênio foi única. Também nesses estudos não foram caracterizados os aspectos metabólicos da gramínea forrageira.

Dessa forma, objetiva-se estudar as alterações metabólicas e as consequências produtivas no capim tanzânia, em função do fornecimento de doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ , em relação às modificações morfogênicas, produtivas, metabólicas e nas concentrações de nitrogênio total. A hipótese testada foi que o suprimento de nitrogênio com maior proporção de NH_4^+ ou exclusivamente de NO_3^- gera estresse nas plantas, que ocasionam alterações nos aspectos morfogênicos (área foliar, emissão de folhas e perfilhos), produtivos (produção de massa seca) e metabólicos (atividade enzimática).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização das pastagens brasileiras e do capim tanzânia

Devido às características climáticas e extensão territorial que são muito favoráveis à pecuária de corte, o Brasil possui hoje o maior rebanho comercial bovino do mundo, com cerca de 193,4 milhões de animais (FNP, 2013), e nos anos recentes tem ocupado a posição de maior exportador mundial de carne (GARCIA et al., 2011).

A pecuária brasileira é caracterizada por criar grande parte do rebanho bovino sob pastejo (FERRAZ; FELÍCIO, 2010), sendo as forragens a forma mais prática e econômica de produzir e oferecer alimento aos animais.

O uso de gramíneas da espécie *Panicum maximum* é muito importante para a produção dos animais em regiões de clima tropical e subtropical. O capim tanzânia tem sido amplamente utilizado desde seu lançamento pela EMBRAPA em 1990, devido ao fato de possuir potencial para alta produtividade e adaptação às diversas condições edafoclimáticas (JANK et al., 2010). Grande parte das áreas ocupadas por pastagens no Brasil está em processo de degradação, o que tem ocorrido, entre outros motivos, pela baixa fertilidade natural dos solos e falta de reposição de nutrientes via aplicação de fertilizantes. Assim, há demanda do conhecimento das necessidades nutricionais das plantas forrageiras, como importante requisito para a produção de forragem em quantidade e valor nutritivo adequado.

Original de Tanzânia na África, o capim tanzânia foi coletado por franceses do Office de la Recherche Scientifique et Technique d' Outre-Mer (ORSTOM) em 1969 e identificado como ORSTOM T58. A introdução no Brasil aconteceu em 1984. Após trabalho de seleção coordenado pela EMBRAPA, o *Panicum maximum* Jacq. cv. tanzânia foi liberado para uso comercial em 1990 (SANTOS; COSTA, 2006).

O cultivar tanzânia apresenta elevado potencial de produção anual (massa seca total de até 33 t ha⁻¹ de massa seca de folhas até 26 t ha⁻¹), com 12,7 g kg⁻¹ e 9 g kg⁻¹ de proteína bruta em folhas e em colmos, respectivamente (SAVIDAN et al., 1990), além da adaptação às diversas condições edafoclimáticas (JANK et al., 2010). Em razão do metabolismo fisiológico C4 dessa forrageira, possui alta eficiência no uso da radiação solar e absorção de elementos essenciais presentes

no solo (dentre eles o nitrogênio), o que propicia aumento na taxa de aparecimento de folhas e de perfilhos (ALEXANDRINO et al., 2005; MARTUSCELLO et al., 2005).

Em relação à morfologia, o capim tanzânia é do tipo cespitoso, podendo atingir altura de 1,30 m (quando em crescimento livre), folhas decumbentes com largura de 2,0 a 2,6 cm, não possui pilosidade, os colmos são levemente arroxeados e possui inflorescência do tipo panícula (JANK et al., 2010).

O capim tanzânia possui elevado valor nutritivo e alimentício, moderada resistência à cigarrinha das pastagens, fácil manejo em relação à uniformidade de pastejo e maior relação folha:colmo. É conhecido por ser exigente em fertilidade do solo e por possuir elevada produção de massa seca (MACHADO et al., 1998; REGO, 2001).

2.2 Nitrogênio e sua importância para plantas forrageiras

Embora seja o gás mais abundante da atmosfera (78% do volume total), o nitrogênio molecular (N_2) não é utilizado diretamente pelas plantas. Assim, as principais fontes de nitrogênio no solo para as plantas são provenientes da matéria orgânica (materiais tanto de origem vegetal quanto de origem animal), fertilizantes nitrogenados, sais de NH_4^+ e NO_3^- que pelas chuvas entram no solo e a fixação biológica de nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O nitrogênio é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas, e constitui aproximadamente 1 a 6 g kg^{-1} da massa seca dos vegetais (HAVLIN et al., 2005). Esse elemento é constituinte de vários compostos orgânicos como: aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, além de componentes do metabolismo secundário como os alcalóides (MENGEL; KIRKBY, 2001). O nitrogênio também participa de processos tais como absorção iônica, respiração, síntese, multiplicação e diferenciação celular, além de ser constituinte da molécula de clorofila (MALAVOLTA, 2006).

O fornecimento inadequado de nitrogênio pode resultar em deficiências nutricionais que são visualizadas como clorose e necrose nas folhas mais velhas, dormência de gemas laterais, menos perfilhos, senescência precoce e folhas pouco desenvolvidas (MALAVOLTA, 2006). A falta de nitrogênio também compromete o desenvolvimento radicular, gerando alterações em sua estrutura e na proporção raízes/brotos (MOROT-GAUDRY; TOURAINE, 2001).

Por definir características como tamanho das folhas e colmos e aparecimento e desenvolvimento dos perfilhos, que são fatores diretamente relacionados à produção de massa seca pela planta forrageira, o nitrogênio se faz extremamente necessário para a produtividade de gramíneas forrageiras (CORSI, 1984; WERNER, 1986).

Paciullo et al. (2011) concluíram que a adubação nitrogenada resultou em incremento na taxa de aparecimento de folhas, número de perfilhos e de folhas vivas e no comprimento final da lâmina foliar para diversas espécies de *Brachiaria*. Premazzi, Monteiro e Oliveira (2011) encontraram modificação positiva no comprimento final da lâmina foliar, área foliar e taxa de alongamento de folhas do capim tifton-85 (*Cynodon* spp.) com o fornecimento de nitrogênio. Schnyder e Visser (1999) afirmaram que as plantas forrageiras mobilizam as reservas nitrogenadas para garantir a rebrotação após a remoção das folhas.

Nabinger e Medeiros (1995) relataram que a disponibilidade de nitrogênio controla os processos de crescimento e desenvolvimento da planta, devido à maior rapidez de formação das gemas axilares e de iniciação dos perfilhos correspondentes. Porém, essa iniciação só se manifesta enquanto o índice de área foliar não for maior que um valor crítico, no qual altera a quantidade de luz que atinge as gemas mais tardias. Além do número de folhas, é necessário ter o conhecimento sobre a área foliar da gramínea. Santos Junior e Monteiro (2003) verificaram que as doses de nitrogênio na solução nutritiva necessárias para a maximização da área foliar no capim marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) variaram de 19,36 a 21,14 mmol L⁻¹. Lavres Junior e Monteiro (2003) avaliaram os efeitos das combinações de doses de nitrogênio e de potássio na área foliar do *Panicum maximum* cv. Mombaça e verificaram a máxima área foliar da gramínea no intervalo das doses de nitrogênio de 24 a 33 mmol L⁻¹.

Conforme observado por Ribeiro (1995), a utilização da adubação nitrogenada estimula o crescimento mais rápido das plantas forrageiras. Abreu (1994) relatou aumentos no número de perfilhos, na produção de massa seca da parte aérea e na concentração de nitrogênio total na parte aérea e nas raízes das plantas, como consequência do fornecimento de doses de nitrogênio ao capim marandu.

A resposta da pastagem à aplicação de fertilizantes nitrogenados em uma região específica depende principalmente do suprimento de nitrogênio no solo e das

condições climáticas (WHITEHEAD, 2000). Segundo esse autor, inicialmente há resposta linear da adubação nitrogenada na produção de massa seca da forragem até um ponto a partir do qual a produção de massa seca se estabiliza, podendo até ser menor. A resposta real durante a fase linear no aumento de produção de massa seca depende de vários fatores, como: fornecimento de nitrogênio, condições climáticas, disponibilidade de água e suprimento de outros nutrientes.

Dourado et al. (2009) concluíram que a adubação nitrogenada promoveu aumento na produção de massa seca do capim piatã (*Brachiaria brizantha* cv. Piatã) e descreveram que a dose de nitrogênio de 411 kg ha⁻¹ produziu 36; 9; 0,5 e 3% mais massa seca do que as doses de 125, 250, 375 e 500 kg ha⁻¹, respectivamente.

Com relação ao crescimento das raízes, Marschner (1995) reportou que o suprimento de nutrientes altera fortemente o desenvolvimento das raízes, acrescentando que o efeito é mais marcante para o fornecimento de nitrogênio em relação aos outros nutrientes. Se a planta estiver em ambiente com baixa concentração de nitrogênio, ela aloca grande parte massa seca total nas raízes (HILL et al., 2006), o que gera mudanças na forma do sistema radicular.

Batista e Monteiro (2006) verificaram que em baixas doses de nitrogênio a superfície radicular do capim marandu foi menor do que quando as plantas foram submetidas a altas doses de nitrogênio. Conforme Fitter (1996) e Lavres Junior e Monteiro (2003) em condição de baixo fornecimento de nitrogênio a planta produz raízes muito finas, o que resulta em maior comprimento específico, reduzindo a massa seca e o volume de raízes da planta.

O fornecimento inapropriado de nitrogênio gera estresse ocasionado pela oxidação do óxido nítrico (NO) por radicais de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que resultam na formação do radical hidroxila (OH) e dióxido de nitrogênio (NO₂) e a produção fotoquímica de O₃, compostos estes capazes de promover alterações morfológicas nas plantas forrageiras, como diminuição da taxa de perfilhamento, menor número de folhas vivas e baixa produção de massa seca (MAGALHÃES et al., 2006). A situação de mudança da morfologia é comum em plantas que estão em estresse por falta de nutrientes (SCHIPPERS; OLFF, 2000). Por outro lado, em condições de excesso de nitrogênio a planta usualmente vegeta muito e armazena menos carboidratos do que em condições normais. O excesso de nitrato pode ser acumulado nos vacúolos, mas NH₄⁺ em excesso é tóxico podendo, por exemplo, desacoplar a fotofosforilação oxidativa (SOUZA; CARVALHO, 2011).

Segundo Salvador, Moreira e Muraoka (1999), a toxidez por excesso de nitrogênio favorece a não absorção de outros nutrientes disponíveis para a planta, pois o excesso de um nutriente pode induzir a deficiência de outro.

2.3 Metabolismo do nitrato e amônio

O nitrogênio é absorvido pelas plantas, principalmente, nas formas de NO_3^- ou NH_4^+ e grande parte das culturas tem preferência pela absorção de NO_3^- (HAVLIN et al., 2005). Essa preferência depende da espécie da planta e de alguns fatores ambientais, como pH, temperatura e quantidade de carboidratos nas raízes (MENGEL; KIRKBY, 2001). Grande parte das gramíneas, à exceção de alguns cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), utilizam ambas as formas de nitrogênio e, em solos bem aerados, a absorção da forma nítrica é predominante (HAVLIN et al., 2005). Entretanto, estudos recentes apontam que a nutrição amoniacal deve ser mais estudada uma vez que o aumento na concentração de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera pode inibir a assimilação de NO_3^- , o que sugere que o fornecimento de NO_3^- e NH_4^+ para as plantas irá se tornar cada vez mais importante na determinação da produtividade e na qualidade do produto agropecuário (BLOOM et al., 2010).

A absorção de NO_3^- e NH_4^+ pelas plantas ocorre através de sítios proteicos específicos existentes na membrana plasmática, que podem ser de alta ou baixa afinidade, dependendo da concentração de nitrogênio no meio externo. A absorção de NO_3^- é do tipo simporte com gasto de energia, associado à absorção de cátions (K^+ , Mg^{+2}) e à entrada de H^+ , e nesse processo ocorre a excreção de ânions (HCO_3^- ou OH^-) para manter a eletroneutralidade na planta, aumentando o pH do meio (FERNANDES; SOUZA, 2006).

Acrescido ao gasto energético na absorção de NO_3^- , antes de ser incorporado em aminoácidos, o ânion precisa ser reduzido a NH_4^+ em processos que são catalisados pelas enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, com dependência de suprimento de energia. Depois da redução a NH_4^+ , ou através da absorção direta desta forma, o nitrogênio é incorporado em aminoácidos em reações de aminações e transaminações catalisadas primariamente pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase, na rota conhecida como GS-GOGAT, ou pela rota

alternativa pela glutamato desidrogenase (MENGEL; KIRKBY, 2001; FERNANDES; SOUZA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Quando o nitrogênio é absorvido na forma de NH_4^+ pode ser acumulado no vacúolo ou ser rapidamente incorporado a compostos orgânicos, uma vez que elevadas doses de NH_4^+ são tóxicas às plantas, devido ao NH_4^+ alterar o gradiente de prótons necessários ao transporte de elétrons nos processos fotossintéticos e respiratórios (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Com relação ao acúmulo de NH_4^+ nas plantas, Fernandes e Rossiello (1986) constataram que em condições ideais (como fotossíntese adequada e cadeia carbônica suficiente para incorporação) ele não é acumulado. O aumento da concentração de NH_4^+ nas plantas pode ser ocasionado por absorção excessiva do íon NH_4^+ ou pela falta de esqueletos carbônicos para sua redistribuição.

Quando absorvido na forma de NH_4^+ , a assimilação do nitrogênio exige gasto energético cinco vezes menor do que quando a planta absorve NO_3^- (FAGERIA, 2009). O conhecimento da proporção de NO_3^- e NH_4^+ na solução nutritiva é de extrema importância no que se refere à aquisição de nitrogênio pelas plantas (MILLS et al., 1976). A utilização de NO_3^- em solução nutritiva mostrou aumento na absorção de potássio, magnésio e cálcio, compensando a elevada absorção do nitrogênio na forma desse ânion (ADAMS, 1981).

Santos, De Bona e Monteiro (2013), utilizaram as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0, 85/15, 70/30, 55/45, 40/60 e 25/75 e observaram que a produção de massa seca apresentou valores mais elevados em plantas de *Panicum maximum* cv. Aruana quando foram oferecidas as proporções de 70/30 e 55/45. Acrescentaram que o fornecimento de nitrogênio na solução nutritiva como NO_3^- ou NH_4^+ superior a cerca de 70 ou 50%, respectivamente, proporcionou menor produção de forragem desse capim.

2.4 Estresse oxidativo

Com exceção dos microrganismos aeróbios, em todos os sistemas biológicos, desde os mais simples (como os procariontes) até os mais especializados como os mamíferos e plantas (SORG, 2004), as espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas nas mitocôndrias como um subproduto do

metabolismo normal (FRIDIVITCH, 1999) durante a produção de energia (SORG, 2004).

As EROs mais comuns são os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila ($OH\cdot$), peroxila (RO_2), alkoxila (RO) e hidroperoxila (HO_2). O óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO_2) são espécies reativas de nitrogênio (SOUZA et al., 2007). Outras moléculas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrato ($ONOO$) não são radicais livres, mas podem conduzir à formação deles por meio de reações químicas (EVANS; HALLIWELL, 2001).

A geração de EROs faz parte do metabolismo aeróbio normal mas, em diversas situações, a produção dessas espécies é aumentada, seja por fator biótico ou abiótico. Dentre os fatores bióticos podem ser citados: metabolismo aeróbio normal, cadeia respiratória e reações de Fenton e Haber-Weiss (GEORGIEVA, 2005; SCANDALIOS, 2005). Os fatores abióticos envolvem vários fatores ambientais de estresse como: seca, metais pesados, elevadas concentrações de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição do ar, herbicidas, estresse físico e mecânico e também como resposta aos estresses bióticos como o ataque de patógenos (BHATTACHARJEE, 2005).

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (EROs) é resultante do metabolismo de oxigênio (GIASSON et al., 2002).

A peroxidação lipídica é uma das mais graves consequências do estresse oxidativo, pois gera danos nas membranas causados pela oxidação resultando em aumento da fluidez da membrana, comprometimento da sua integridade e inativação da interação entre membrana/receptor e membrana/enzima (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 1986).

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causado pelo estresse provoca danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (GASPAR et al., 2002). O equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs deve ser mantida nas células para evitar distúrbios metabólicos ou oxidação excessiva (GILL; TUTEJA, 2010; ANJUM et al., 2012). Em condições de excesso de NH_4^+ ocorre menor produção de raízes, o que impede as plantas de rebrotarem vigorosamente (BASTOS, 2012). O estresse causado pela deficiência ou excesso de nutrientes,

incluindo o nitrogênio, gera alteração da morfologia da planta (SCHIPPERS; OLFF, 2000).

As plantas possuem vários mecanismos para evitar o acúmulo de EROs. Segundo Mittler (2002), esses mecanismos incluem adaptações anatômicas, como o movimento e o dobramento das folhas, o desenvolvimento de epiderme refratária e de estômatos escondidos sob estruturas especializadas, mecanismos moleculares que rearranjam os aparatos fotossintéticos e seus pigmentos de acordo com a qualidade e a intensidade da luz, ou completamente suprimem a fotossíntese. Tais mecanismos são dotados de sistema eficaz 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 EROs e, assim é importante para a manutenção da homeostase celular nas plantas sob condições de estresse oxidativo.

Entre os antioxidantes não enzimáticos o tripeptídeo glutathione (GSH) é considerado como o mais importante na defesa intracelular contra EROs (GILL; TUTEJA, 2010; ANJUM et al., 2012). A glutathione atua diretamente na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da via enzimática no ciclo ascorbato-glutationa, principal modo de ação da GSH no combate aos radicais livres, possibilitando a regeneração do ascorbato reduzido (AsA), outro antioxidante é muito importante nas células das plantas, especialmente para a detoxificação de H_2O_2 .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e época

O experimento foi desenvolvido com *Panicum maximum* cultivar Tanzânia em casa de vegetação localizada em Piracicaba – SP, no período de 12 de fevereiro de 2014 a 23 de abril de 2014.

3.2 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento de blocos completos ao acaso, em esquema fatorial 3×3 , com o estudo de três doses de nitrogênio (3, 15, 27 mmol L^{-1} , correspondentes à baixa, normal da solução de Hoagland e Arnon e alta disponibilidade de nitrogênio, respectivamente) com três proporções (%) de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (100/0, 70/30 e 40/60), com seis repetições. Assim, as nove combinações estudadas foram: 3-100/0; 3-70/30; 3-40/60; 15-100/0; 15-70/30; 15-40/60; 27-100/0; 27-70/30 e 27-40/60. As plantas de três repetições do experimento foram utilizadas nas avaliações produtivas e nutricionais das plantas, enquanto as plantas das outras três repetições foram empregadas nas avaliações bioquímicas.

3.3 Soluções nutritivas

As soluções nutritivas foram calculadas a partir da solução completa de Hoagland e Arnon (1950), para atender as combinações estabelecidas (Tabela 1). O fornecimento de potássio, cálcio e magnésio da solução original foi modificado de 6, 5 e 2 mmol L^{-1} para 10, 7 e 4 mmol L^{-1} , respectivamente (BASTOS, 2012).

Tabela 1 - Volume das soluções estoque utilizadas no preparo das soluções nutritivas para atender as doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+

Proporções $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	100/0			70/30			40/60		
Nitrogênio (mmol L^{-1})	3	15	27	3	15	27	3	15	27
Solução estoque	Volume pipetado (mL L^{-1})								
KH_2PO_4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KCl	6	4	-	6,9	7	2,2	7,8	9	9
KNO_3	3	5	9	2,1	2	6,8	1,2	-	-
MgSO_4	2	2	2	2	2	2	2	2	2
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	-	2	2	-	-	2	-	-	-
MgCl_2	2	-	-	2	2	-	2	2	2
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	-	3	7	-	2	-	-	-	-
CaCl_2	7	4	-	7	5	7	7	7	7
NH_4NO_3	-	-	-	-	4,5	8,1	-	6	10,8
NH_4Cl	-	-	-	0,9	-	-	1,8	3	5,4
Micronutrientes*	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe - EDTA**	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*Composição da solução estoque de micronutrientes (mmol L^{-1}): $\text{H}_3\text{BO}_3 = 46,27$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 9,15$; $\text{ZnCl}_2 = 0,73$; $\text{CuCl}_2 = 0,73$ e $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 0,085$. **Preparo da solução de Fe-EDTA: 26,1 g de EDTA dissódico foram dissolvidos em 286 mL de NaOH 1 mol L^{-1} , com posterior adição de 24,0 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e arejamento por uma noite. Após essa etapa o volume foi completado a 1 L com água desionizada

3.4 Instalação e condução do experimento

As sementes de *Panicum maximum* cv. Tanzânia foram germinadas em bandejas plásticas contendo areia lavada em água corrente e em seguida em água desionizada. A areia foi irrigada diariamente com água desionizada.

Aos quinze dias após a semeadura foram transplantadas quinze mudas do capim para vasos com capacidade de 3,6 L contendo quartzo moído (sílica) como substrato, o qual também foi lavado com água corrente e desionizada. A cada vaso foi adicionado 1 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) correspondente a cada combinação em estudo (Tabela 1) e diluída a 20%. Essa solução foi circulada pela sílica seis vezes ao dia e mantida durante a noite nos vasos por cinco dias, quando houve a substituição pela solução nutritiva definitiva (100% da força iônica). A solução definitiva foi repostada semanalmente, circulada pela sílica três vezes ao dia e drenada durante a noite.

Desbastes foram realizados em cada unidade experimental durante os dias em que as plantas receberam solução nutritiva diluída a 20% (adaptação das plantas ao fornecimento de nutrientes), até restarem seis mudas homogêneas por vaso.

3.5 Coleta do material vegetal

Foram conduzidos dois cortes em todas as plantas, sendo que três blocos foram utilizados para as avaliações morfogênicas produtivas. O primeiro corte do capim ocorreu aos 41 dias após o transplante e o segundo aos 27 dias após o primeiro corte. Para as avaliações morfogênicas e produtivas a parte aérea da planta foi separada em: a) lâminas de folhas recém-expandidas (LR), ou seja, folhas completamente expandidas, com lígula visível; b) demais lâminas foliares (DL), ou seja, todas as lâminas das demais folhas: lâminas não totalmente expandidas, folhas maduras e folhas em processo inicial de senescência; c) colmos mais bainhas (CB) das folhas.

O primeiro corte foi realizado a 5 cm de altura em relação à sílica para permitir boa rebrotação das plantas, enquanto no segundo corte as mesmas foram cortadas rente à sílica. Ao término do segundo corte as raízes das gramíneas foram separadas da sílica, utilizando-se peneira de malha de 0,25 mm, água corrente e posteriormente água desionizada.

Todo o material colhido foi colocado para secar em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, até atingir massa constante. Posteriormente foi realizada a pesagem, moagem em moinho tipo Wiley e armazenamento do material vegetal em sacos plásticos para as determinações de nitrogênio total e NO_3^- e NH_4^+ .

Para as avaliações metabólicas os dois cortes foram realizados em outros três blocos experimentais, sendo o primeiro corte aos 42 dias após o transplante e o segundo aos 29 dias após o primeiro corte. Assim como no primeiro caso, a parte aérea da planta foi separada em: LR; DL e CB. Após a realização do segundo corte também houve separação das raízes das plantas da sílica, com o auxílio de peneira e água corrente e posterior lavagem com água desionizada.

A separação foi feita no mais curto tempo possível e as partes da planta foram acondicionadas em envelopes de alumínio mergulhados em nitrogênio líquido, para paralisação das reações bioquímicas. Após essa etapa o material vegetal foi moído com auxílio de moinho IKA, colocado em tubo falcon de 50 mL e guardado em freezer a -80°C, para preservação da atividade enzimática da planta até a realização das avaliações metabólicas.

3.6 Avaliações morfogenéticas e estado nutricional em nitrogênio

3.6.1 Número de folhas e perfilhos

O número total de folhas e perfilhos foi obtido pela da contagem desses componentes na ocasião do primeiro e segundo corte do capim tanzânia.

3.6.2 Emissão de folhas e perfilhos

Os perfilhos e folhas emitidos foram contados a cada três dias durante cada período de crescimento das plantas. As folhas somente foram contadas quando apresentaram a lígula visível. Ao serem contados, os perfilhos novos foram marcados com fios de plástico coloridos e as folhas foram marcadas com tinta permanente.

3.6.3 Determinação da área foliar

Após a separação da parte aérea das plantas em cada colheita, foi determinada a área das lâminas foliares (LR e DL), utilizando-se o integrador de área foliar LICOR[®] modelo LI-3000. A área foliar total foi obtida pelo somatório das áreas encontradas para cada um dos tipos de tecidos foliares em cada unidade experimental.

3.6.4 Determinação da produção de massa seca

A quantidade de massa seca da parte aérea e das raízes das plantas de cada vaso foi obtida por meio de pesagem do material secado a 65°C, com o uso de uma balança semi-analítica. A produção de massa seca da parte aérea foi obtida pelo somatório das massas dos componentes LR, DL e CB.

3.6.5 Concentração relativa de clorofila (valor SPAD)

A concentração relativa de clorofila nas folhas foi estimada indiretamente por meio de leitura do valor SPAD utilizando-se o aparelho Chlorophyll Meter SPAD[®] 502, que se baseia na quantidade de luz que atravessa a folha. As leituras SPAD foram

realizadas um dia antes da colheita em cada idade de crescimento e um dia antes dos dias de determinação da atividade da enzima redutase do nitrato. Para tanto, colocou-se o aparelho na porção média da segunda lâmina de folha recém-expandida do perfilho principal de cada planta e realizaram-se dez leituras referentes a cada unidade experimental. O valor SPAD foi composto da média dos dez valores observados.

3.6.6 Determinações de nitrogênio total, nitrato e amônio nos tecidos vegetais

As concentrações de nitrogênio total, NO_3^- e NH_4^+ foram determinadas na parte aérea e nas raízes das plantas nas amostras coletadas em cada corte das plantas.

Para a determinação de nitrogênio total utilizou-se a metodologia descrita por Sarruge e Haag (1974) com a realização da digestão sulfúrica, destilação em aparelho semi-micro Kjeldahl e titulação com ácido sulfúrico $0,025 \text{ mol L}^{-1}$.

Para as determinações de NH_4^+ e NO_3^- foi utilizado o método de extração com KCl e agitação por 5 minutos, conforme proposto por Tedesco (1985).

3.6.7 Avaliações nas raízes

Após o segundo corte das plantas (aos 27 e 29 dias de rebrotação, para avaliações produtivas e metabólicas, respectivamente) as raízes foram retiradas da sílica e lavadas em água corrente e desionizada utilizando peneira com malhas de 0,25 mm para evitar a perda das raízes mais finas. Realizou-se o mesmo procedimento de análises da parte aérea para as raízes.

3.7 Avaliações metabólicas

3.7.1 Enzimas de incorporação de nitrogênio

3.7.1.1 Atividade da redutase do nitrato (RN)

A atividade da redutase do nitrato foi determinada aos 40 dias do primeiro e aos 26 dias do segundo crescimento da gramínea forrageira, utilizando-se o método descrito por Mulder (1959). Antes da amostragem das lâminas foliares, as plantas

foram colocadas em câmara de crescimento, para exposição à luz artificial por duas horas no dia da determinação, de forma a homogeneizar a luminosidade incidente em todas as unidades experimentais.

Coletaram-se amostras do terço médio da lâmina foliar da segunda folha recém-expandida (LR), incubando-se 0,2 g da amostra do material vegetal fresco em tubos de ensaio contendo KNO_3 em tampão fosfato. Os tubos foram mantidos em ambiente escuro e colocados em banho-maria a 35°C por duas horas, com agitações a cada cinco minutos. A seguir, uma alíquota de 1 (um) mL foi retirada de cada tubo e transferida para erlenmeyer onde sequencialmente foram adicionados ácido sulfanílico diluído em HCl (20 mL L^{-1}) e alfa-naftilamina.

Para a leitura das amostras utilizou-se espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 560 nm e a atividade enzimática foi expressa pela quantidade de nitrito (NO_2^-) produzida. Empregou-se uma sequência de oito pontos para preparação de curva padrão.

3.7.1.2 Atividade da glutamina sintetase (GS)

A atividade da glutamina sintetase foi determinada nas lâminas das folhas recém-expandidas coletadas no primeiro e segundo cortes do capim. O método utilizado foi descrito por Elliott (1953), com modificações. Foi coletado 0,5 g do material verde, que foi macerado em nitrogênio líquido e colocado em 1,5 mL do tampão de extração (50 mmol L^{-1} de tris-HCl a pH 7,5; 2 mmol L^{-1} de mercaptoetanol e 1 mmol L^{-1} de EDTA) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C . Retirou-se 0,3 mL do sobrenadante, sendo adicionado 0,5 mL de tris-HCl (200 mmol L^{-1} a pH 7,5), 0,2 mL de ATP (50 mmol L^{-1} a pH 7,0), 0,5 mL de ácido glutâmico (500 mmol L^{-1} a pH 7,5), 0,1 mL de sulfato de magnésio (1 mol L^{-1}), 0,3 mL de hidroxilamina (100 mmol L^{-1}) e 0,1 mL de cisteína (100 mmol L^{-1}), totalizando 2 mL. Para cada amostra foi utilizado um branco com todas as soluções empregadas, exceto o ATP e o ácido glutâmico, sendo o restante do volume de 2 mL completado com água desionizada. O branco e a amostra foram colocados em banho-maria a 30°C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL da solução contendo FeCl_2 ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$), TCA ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) e HCl (1 mol L^{-1}) na proporção de 1:1:1. Em seguida centrifugou-se a mistura a 5000 rpm e no sobrenadante realizou-

se a leitura a 540 nm em espectrofotômetro para determinar a formação de γ -glutamilhdroxamato, empregando-se uma curva padrão.

3.7.2 Estresse oxidativo

3.7.2.1 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio

A peroxidação lipídica foi determinada pelo teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). O teor de substâncias reativas ao ácido (TBARS) foi quantificado como produto final do processo de peroxidação de lipídios, com leituras a 535 e 600 nm. A quantificação do malondialdeído (MDA), que reflete a peroxidação lipídica, foi determinada de acordo com o método descrito por Cakmak; Horst (1991). A massa de 0,2 g de tecido vegetal foi macerada em N_2 líquido e homogeneizado em 3 mL de TCA $g\ L^{-1}$ com 0,04g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (m/m). O homogeneizado foi dividido em dois tubos *eppendorfs* de 1,5 mL e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos; 0,25 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de TCA 200 $g\ L^{-1}$ e TB 5 $g\ L^{-1}$ e aquecido a 95°C por 30 minutos e em seguida foi resfriado em banho de gelo. Após o resfriamento, o tubo foi centrifugado novamente a 10.000 rpm por 10 minutos, seguido de leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm.

A quantificação de peróxido de hidrogênio ocorreu de acordo com o método descrito por Alexieva et al. (2001). A partir da mesma amostra utilizada para quantificação de MDA foi retirada alíquota 0,2 mL, que foi adicionada a 1 mL de solução contendo 0,8 mL de KI 1 $mol\ L^{-1}$ e 0,2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 $mol\ L^{-1}$ pH 7,5. Essa mistura foi mantida no gelo e no escuro por uma hora, após o que realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

3.7.2.2 Extração proteica

Amostras de tecido vegetal foram maceradas em N_2 líquido até completa formação de pó. O material macerado foi homogeneizado em solução tampão fosfato de potássio 100 $mmol\ L^{-1}$ (pH 7,5) acrescido de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 1 $mmol\ L^{-1}$ e ditioneitol (DTT) 3 $mmol\ L^{-1}$ na proporção de 1:5. Foram adicionados 0,04g de PVPP no momento da homogeneização. O extrato resultante foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Após esse

período, o sobrenadante foi aliquotado e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

3.7.2.3 Determinação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada no sobrenadante de cada amostra de tecido vegetal, segundo o método descrito por Bradford (1976), no qual 20 µL do extrato foram homogeneizados com 1 mL de reagente de Bradford. A solução foi deixada em temperatura ambiente por cinco minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

3.7.3 Enzimas do sistema antioxidativo

3.7.3.1 Atividade da catalase (CAT)

Determinou-se a atividade da CAT em espectrofotômetro de acordo com o método descrito por Kraus et al. (1995), com modificações de Azevedo et al. (1998). O meio de reação continha 1 mL de solução 30 mmol L⁻¹ H₂O₂ em tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato vegetal e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ em intervalos de 10 segundos durante 1 minuto, na absorbância de 240 nm.

3.7.3.2 Atividade da glutathiona redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada de acordo com o método descrito por Smith et al. (1988), com modificações de Azevedo et al. (1998), no qual 1,7 mL do meio de reação contém 5,5' dithio-bis-[ácido 2-nitrobenzóico] (DTNB) 1 mmol L⁻¹; glutathiona oxidada (GSSG) 1 mmol L⁻¹, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) 0,1 mmol L⁻¹ e 50 µL de amostra proteica em solução tampão fosfato de potássio 0,1 mol (a pH 7,5). A leitura foi realizada a 412 nm.

3.7.3.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida em sistema não desnaturante

Do extrato proteico foram utilizados 20 µg de proteínas para separação eletroforética em PAGE não desnaturante a 12%, 20 mA/placa por aproximadamente 4,5 horas, de acordo com Laemmli (1970), sem dodecilsulfato de sódio (SDS). A revelação do gel seguiu o método descrito por Beauchamp; Fridovich (1971), com modificações de Azevedo et al. (1998), no qual o gel foi lavado em água desionizada e incubado à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 minutos em solução tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (a pH 7,8); 1 mmol L⁻¹ de EDTA; 0,05 mmol L⁻¹ de riboflavina; 0,1 mmol L⁻¹ de nitroazul tetrazólio e 0,3 g L⁻¹ de N,N,N',N' (tetrametiletilenodiamina). Após o período de incubação, a solução de reação foi removida, os géis foram lavados em água desionizada e submetidos à iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas sob fundo roxo, em seguida os géis foram documentados no programa Image Scanner[®].

3.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância com o uso do procedimento GLM do aplicativo Statistical Analysis System (SAS, 2004). Tratou-se, inicialmente, de verificar a significância da interação doses de nitrogênio x formas de nitrogênio nos parâmetros nutricionais, produtivos, morfogênicos e metabólicos.

Quando essa interação foi significativa o desdobramento das médias foi analisado pelo teste LSD (least-significance difference). Quando a interação não foi significativa e havendo efeito da média realizou-se apenas o teste de comparação de média.

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliações morfológicas

4.1.1 Número de folhas e perfilhos

Para o número total de folhas e de perfilhos não foi constatada significância da interação doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva, tanto no primeiro quanto no segundo corte do capim tanzânia. Entretanto, houve significância para as doses de nitrogênio em termos do número total de folhas na ocasião dos dois cortes das plantas (Figura 1 A e B). Para o número de perfilhos também as doses de nitrogênio tiveram significância (Figura 2), na contagem realizada no primeiro corte das plantas.

Figura 1 - Número total de folhas (NTF) na ocasião do primeiro (A) e segundo (B) cortes do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, em cada corte, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Tanto no primeiro quanto no segundo corte do capim, a mais baixa dose de nitrogênio (3 mmol L⁻¹) resultou no menor número de folhas nas plantas. Ao se comparar a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ com as doses de 15 e 27 mmol L⁻¹, nota-se incremento de 1,7 e 1,5 vezes no número de folhas no capim no primeiro e no segundo corte, respectivamente.

Os resultados de maior número de folhas com o aumento no suprimento das doses de nitrogênio estão de acordo com estudos envolvendo gramíneas forrageiras. Quando as plantas que foram adequadamente nutridas com nitrogênio tiveram o máximo número de folhas por perfilho, em relação às que apresentaram deficiência desse nutriente (MARTUSCELLO et al., 2005; SILVA, 2006; CABRAL et al., 2012).

No presente estudo é possível observar (Figura 1 A e B) que tanto para o primeiro quanto para o segundo corte, em condição de baixo fornecimento de nitrogênio, as plantas de capim tanzânia apresentaram o menor número de folhas. Isso pode ser explicado pelo fato do nitrogênio ser responsável pelo desenvolvimento de folhas (CORSI, 1984; WERNER, 1986).

Basso et al. (2010) descreveram que o aumento no número de folhas está diretamente relacionado à aplicação de nitrogênio. Pinheiro et al. (2015) estudaram o acúmulo de massa seca e a composição morfológica do pasto de capim tanzânia adubado com nitrogênio ou consorciado com estilosantes campo grande e concluíram que na maior dose de nitrogênio (225 kg ha^{-1}) o pasto apresentou maior número de folhas.

Figura 2 – Número total de perfilhos (NTP) no primeiro corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Para o número de perfilhos também foi observado o benefício da aplicação de nitrogênio (Figura 2). A dose de nitrogênio de 3 mmol L^{-1} resultou em menor número de perfilhos do que nas doses de 15 e 27 mmol L^{-1} na solução nutritiva. Houve

aumento de 1,8 vezes no número de perfilhos quando se comparou as duas doses mais altas com a mais baixa dose de nitrogênio.

O efeito positivo da adubação nitrogenada no perfilhamento de gramíneas forrageiras tem sido relatado por outros autores (MARTUSCELLO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015). Este efeito está associado ao estímulo no crescimento e multiplicação de células vegetais, uma vez que esse nutriente é constituinte de ácidos nucleicos e proteínas celulares, além de promover a síntese e translocação de fitohormônios envolvidos na quebra da dormência de gemas laterais localizadas na base da coroa das plantas (JEWISS, 1972; DOUST, 2007; ONGARO; LEYSER, 2007).

Ao estudarem doses de nitrogênio (0, 80, 160 e 240 kg ha⁻¹) em capim massai (*Panicum maximum* cv. Massai), Martuscello et al. (2015) relataram aumento no número de perfilhos das plantas conforme foi incrementado o fornecimento de nitrogênio.

Pinheiro et al. (2015) estudaram doses de nitrogênio (75, 150 e 225 kg ha⁻¹) em capim tanzânia e encontraram maior número de perfilhos quando utilizaram a maior dose de nitrogênio. Resultado semelhante foi descrito por Canto et al. (2012) que avaliaram a produção de capim mombaça em função da adubação nitrogenada (0, 50, 100 e 150 kg ha⁻¹) e também encontraram maior número de perfilhos com a utilização da maior dose de nitrogênio.

Garcez Neto et al. (2002) testaram doses de nitrogênio (0, 50, 100 e 200 mg dm⁻³) num Latossolo Vermelho-Amarelo e verificaram maior número de perfilhos com o aumento do suprimento desse nutriente. Esses autores acrescentaram que o perfilhamento em gramíneas é uma característica estrutural determinante da plasticidade morfogênica das plantas forrageiras influenciada por combinações de fatores nutricionais (entre os quais está o nitrogênio), ambientais e de manejo.

4.1.2 Emissão de perfilhos e folhas

A taxa de aparecimento de folhas (TAF) caracteriza o número médio de folhas surgidas por dia e por perfilho enquanto a taxa de aparecimento de perfilho (TAP) se refere ao número médio de perfilhos surgidos por dia por planta (ANSLOW, 1966).

Para a TAF, não se observou significância para as doses de nitrogênio e para as proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ na solução nutritiva e nem para a interação doses de

nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, durante o primeiro crescimento do capim. Em relação ao período de rebrotação do capim, verificou-se que foi significativa a interação doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Tabela 2). As doses de nitrogênio e as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva resultaram em efeitos significativos na TAP no primeiro crescimento do capim (Figuras 3 e 4).

Figura 3 – Taxa de aparecimento de perfilhos (TAP) no primeiro crescimento do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio na solução nutritiva. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Para as doses de nitrogênio não foi observada diferença significativa entre as doses de 15 e 27 mmol L⁻¹, porém a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ diferiu das demais doses. O incremento foi de 1,8 vezes na TAP, quando se comparou a menor dose de nitrogênio (3 mmol L⁻¹) com as demais doses estudadas (Figura 3).

Não foram constatadas diferenças entre as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva de 70/30 e 40/60 para a TAP no primeiro crescimento do capim. Contudo, quando a solução nutritiva continha o nitrogênio apenas na forma nítrica (100/0) a TAP no primeiro crescimento das plantas foi menor do que nas demais proporções. O incremento de NH_4^+ na solução nutritiva resultou em aumento de 1,2 vezes na TAP quando se comparou a proporção 100/0 com as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 70/30 e 40/60.

Figura 4 - Taxa de aparecimento de perfilhos (TAP) no primeiro crescimento do capim tanzânia, em função das proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

O estabelecimento e a perenidade das gramíneas forrageiras são dependentes, dentre outras variáveis, da capacidade da planta em originar novos perfilhos (PEDREIRA; MELLO; OTANI, 2001).

Martuscello et al. (2015), estudando o efeito de doses de nitrogênio (0, 80, 160 e 240 kg ha⁻¹) em capim massai, verificaram que a TAP foi positivamente influenciada pela dose desse nutriente. Essa observação está de acordo com os resultados do presente trabalho e também corrobora os relatos de Fagundes et al. (2006) e Pereira et al. (2011), de que o nitrogênio estimula a TAP.

Tabela 2 - Taxa de aparecimento de folhas (TAF) durante o segundo crescimento do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva

Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
	-----folhas/dia-----		
3	1,06 aA	0,94 aB	1,24 aA
15	1,47 aA	1,85 aA	1,48 aA
27	1,30 bA	2,21 aA	0,92 bA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Somente dentro da dose de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹ é que foi verificada diferença na TAF no segundo crescimento (rebrotagem) do capim tanzânia. Nessa condição, a proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 70/30 resultou em maior TAF do que nas proporções de 100/0 e 40/60. Dentro das doses de nitrogênio de 3 e 15 mmol L⁻¹ não ocorreram diferenças entre as proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ na solução nutritiva.

A maior dose de nitrogênio (27 mmol L⁻¹), quando fornecida na proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 70/30 na solução nutritiva, resultou no aumento de 1,7 e 2,4 vezes da TAF quando comparada com as proporções de 100/0 e 40/60, respectivamente. Também Oliveira et al. (2007) relataram que, em alta disponibilidade de nitrogênio, as plantas de capim tanzânia tem incremento no alongamento dos entrenós, o que proporciona emissão de folha nova mais precocemente e resulta em aumento na TAF.

Lucena Costa et al. (2014) estudaram o acúmulo de forragem e morfogênese de *Trachypogon plumosus* sob adubação nitrogenada e encontraram valores de 0,155 folhas dia⁻¹ com aplicação de nitrogênio de 155,4 kg ha⁻¹. Lopes et al. (2014) analisaram as características morfogênicas de dois tipos de perfilhos (principal e primário) e produção de biomassa do capim massai adubado com nitrogênio durante o estabelecimento e observaram que na maior dose de nitrogênio (600 mg dm⁻³ de solo) a TAF apresentou valores estimados de 0,154 folhas dia⁻¹. Também Martuscello et al. (2015) aplicaram doses de nitrogênio (0, 80, 160 e 240 kg ha⁻¹) para o capim massai e encontraram valores de aproximadamente 0,1 folha dia⁻¹ para a dose de 240 kg ha⁻¹, confirmando o efeito positivo da adubação nitrogenada na TAF.

Dentre os benefícios resultantes da adubação nitrogenada em cultivo de gramínea forrageira, pode-se destacar a diminuição do intervalo de tempo para aparecimento de folhas (GARCEZ NETO et al., 2002; PATÊS et al., 2007), que consequentemente proporciona aumento da TAF.

4.1.3 Área foliar

A interação doses de nitrogênio × proporções de NO₃⁻/NH₄⁺, foi significativa para a área foliar do capim, na ocasião dos dois cortes das plantas. O desdobramento dessa interação resultou nas médias apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Área foliar do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva

Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
-----cm ² /vaso-----			
-----1º Corte-----			
3	1178 bB	1557 bB	1760 aB
15	3768 aA	4021 aA	2134 bA
27	3037 aAB	4615 aA	2168 bA
-----2º Corte-----			
3	1038 bB	1562 aB	1657 aB
15	3971 aA	4260 aA	2109 bA
27	3459 aA	4675 aA	2137 bA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Tanto nas folhas coletadas na ocasião do primeiro, quanto do segundo corte da gramínea forrageira, as proporções de 100/0 e 70/30 utilizadas nas doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹ na solução nutritiva resultaram em maiores valores de área foliar do que na proporção 40/60 nessas mesmas doses.

Na ocasião do primeiro corte, plantas crescidas na dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ combinada com a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0, resultaram na menor área foliar da gramínea. O incremento da participação do NH_4^+ na solução nutritiva, para essa mesma dose de nitrogênio, resultou em aumento de 1,5 vezes na área foliar, quando se comparou a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 com a de 40/60. Ao se analisar as doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹, nota-se resultado contrário ao encontrado para a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹, com diminuição da área foliar resultante da maior proporção de NH_4^+ na solução nutritiva. A proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 70/30 incrementou em 1,90 e 2,13 vezes a área foliar nas doses nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹, respectivamente, quando comparadas às plantas expostas a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60.

Em relação ao material vegetal coletado no segundo corte das plantas, a menor área foliar foi encontrada na dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹, em decorrência de todas as proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ avaliadas na solução nutritiva.

Ao fornecer nitrogênio (2, 9, 16, 23 e 30 mmol L⁻¹) na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 65/35 para dois períodos de crescimento do capim tanzânia, Silveira e Monteiro (2007) verificaram que ocorreu incremento na área foliar conforme se aumentou o

fornecimento desse nutriente, e obtiveram máxima área foliar com a maior dose de nitrogênio. Megda e Monteiro (2010) concluíram que a área foliar do capim marandu, coletado em dois cortes, foi maximizada com o fornecimento de nitrogênio de 33 mmol L⁻¹ suprido na proporção NO₃⁻/NH₄⁺ de 64,4/35,6.

Os resultados do presente estudo mostraram que os maiores valores de área foliar ocorreram nas doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹ nas proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ de 100/0 e 70/30. Isso está de acordo com os resultados encontrados por Bastos (2012), que verificou maiores valores de área foliar no capim xaraés quando a proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 85/15 foi fornecida na solução nutritiva.

Costa et al. (2011) encontraram respostas positivas na área foliar do capim xaraés (com incremento de 3,1 vezes) quando compararam o tratamento sem aplicação de nitrogênio com o tratamento com a maior dose de nitrogênio (100 mg dm⁻³).

Garcez (2013) estudou quatro cultivares de *Panicum ssp.* e encontrou maior valor de área foliar para o capim tanzânia com o aumento no fornecimento de nitrogênio, de 30 mg dm⁻³ para 300 mg dm⁻³. Esse resultado está em consonância com os do presente estudo, uma vez que o aumento no fornecimento de nitrogênio (de 3 para 15 ou 27 mmol L⁻¹), também resultou em maior área foliar.

4.1.4 Produção de massa seca

A interação doses de nitrogênio × proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ não foi significativa para a produção de massa seca da parte aérea na ocasião do primeiro corte das plantas. Entretanto, para o mesmo corte, foi verificada significância das doses de nitrogênio nessa produção de massa seca (Figura 5).

Figura 5 - Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) no primeiro corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio na solução nutritiva. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Com relação ao segundo corte das plantas, a interação doses de nitrogênio x proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foi significativa. O desdobramento dessa interação proporcionou os resultados mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Produção de massa seca da parte aérea do capim tanzânia no segundo corte, em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva

Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
	-----g/vaso-----		
3	55,00 aB	49,12 aB	53,57 aA
15	68,40 aA	69,59 aA	51,04 bA
27	69,02 aA	72,22 aA	41,66 bB

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Na produção de massa seca obtida no primeiro corte do capim tanzânia (Figura 5) não houve diferença estatística entre as doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹, mas ambas diferiram da produção na dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹. Com o aumento da concentração de nitrogênio na solução nutritiva, ocorreu incremento de 1,3 vezes na produção de massa seca da parte aérea quando se comparou a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ com as doses de 15 e 27 mmol L⁻¹.

Esse resultado é similar aos encontrados na literatura, que demonstram aumento na produção de massa seca de gramíneas forrageiras mediante fornecimento de nitrogênio, o que reflete o incremento do número de perfilhos (DE BONA; MONTEIRO, 2010; VITOR et al., 2014) e a área foliar da gramínea forrageira (SIMÕES et al., 2015).

No presente estudo as doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹ não diferiram entre si quanto à produção de massa seca da parte aérea do primeiro corte do capim. Esses resultados são similares aos de Santos Junior (2001) que, ao estudar a adubação nitrogenada para o capim marandu, também não encontrou diferenças entre as doses de nitrogênio de 210 e 378 mg L⁻¹ (correspondentes a 15 e 27 mmol L⁻¹, respectivamente), na produção de massa seca da parte aérea da gramínea forrageira.

Para o material vegetal coletado no segundo corte das plantas, as doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹ não diferiram estatisticamente entre si nas proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ de 100/0 e 70/30. No entanto, ao comparar as doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹ na proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 com as demais proporções, notou-se que o aumento da proporção de NH₄⁺ na solução nutritiva resultou em menor produção de massa seca da parte aérea das plantas. A menor produção de massa seca obtida mediante o fornecimento da mais alta proporção de NH₄⁺ (40/60) fornecida às plantas foi de 1,36 e 1,73 vezes, quando se comparou a proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 70/30 (que resultou na maior produção de massa seca no segundo corte das plantas) com a proporção de 40/60.

Esse resultado destaca o prejuízo causado às plantas pelo excesso de NH₄⁺ no meio de cultivo. A menor produção de massa seca obtida na parte aérea do segundo corte do capim tanzânia crescido sob alta proporção de NH₄⁺ na solução nutritiva, é consequência da menor área foliar (Tabela 3) das plantas que cresceram nas mesmas condições (15 e 27 mmol L⁻¹ na proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60). Isso comprova que o excesso de NH₄⁺ na solução nutritiva pode desencadear injúrias no crescimento das plantas.

Em relação à proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60, as plantas de capim tanzânia apresentaram perda de 1,29 vezes na produção de massa seca da gramínea, quando se comparou na mesma proporção combinada com as doses de nitrogênio de 3 e 27 mmol L⁻¹. Cao et al. (2011) forneceram nitrogênio na dose de 8 mmol L⁻¹ e

encontraram as maiores produções de massa seca de parte aérea de azevém (*Lolium perene*) nas proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 50/50 e 75/25.

Santos, De Bona e Monteiro (2013) empregaram a dose de nitrogênio em 15 mmol L^{-1} e utilizaram as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0, 85/15, 70/30, 55/45, 40/60 e 25/75 e observaram maior produção de massa seca no capim aruana quando cultivado nas proporções de 70/30 e 55/45. Também constataram que o fornecimento de nitrogênio na solução nutritiva como NO_3^- ou NH_4^+ superior à proporção de 70 ou 50%, respectivamente, proporcionou menor produção de massa seca do capim do que as demais proporções avaliadas.

Para a produção de massa seca de raízes foi verificado efeito significativo das proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ empregadas nesse experimento (Figura 6). Foi possível observar que as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 70/30 e 100/0 foram as que proporcionaram maiores produções de massa seca das raízes do que mediante o emprego da proporção 40/60. Para o capim aruana, Santos, De Bona e Monteiro (2013) mantiveram a dose de nitrogênio em 15 mmol L^{-1} e verificaram que as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 55/45 e 70/30, respectivamente, resultaram em maiores produções de massa seca das raízes do que as demais proporções estudadas (100/0, 85/15, 70/30, 55/45, 40/60 e 25/75).

Quando há baixa disponibilidade de nitrogênio para os capins, as reservas orgânicas (sobretudo compostos nitrogenados) da planta são translocadas das folhas e bases do colmo para as raízes, possibilitando maior exploração do meio de cultivo para aquisição de nutrientes (FERNANDES; SOUZA, 2006).

Figura 6 - Produção de massa seca das raízes (MSR) do capim tanzânia em função das proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

4.2 Estado nutricional em nitrogênio

4.2.1 Valor SPAD

Os valores de leitura SPAD nas folhas diagnósticas (LR) do capim tanzânia, foram significativamente alterados pelas doses de nitrogênio tanto para os obtidos no primeiro quanto no segundo período de crescimento das plantas (Figura 7).

A dose de nitrogênio de 3 mmol L^{-1} resultou em menor valor SPAD, com a média de 25 unidades para os dois períodos de crescimento. Nas LR das plantas crescidas na dose de nitrogênio de 27 mmol L^{-1} o valor SPAD atingiu o máximo de 41 unidades para ambos os períodos de crescimento. Nos dois períodos de crescimento e nas três doses de nitrogênio estudadas, é possível notar claramente a relação direta existente entre o valor SPAD e o suprimento de nitrogênio às plantas.

Em média, cerca de 50 a 70% do nitrogênio presente nas folhas está relacionado ao cloroplasto (CHAPMAN; BARRETO, 1997). A maior disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo proporciona mais síntese de clorofila pelas plantas e isso aumenta a intensidade da coloração verde nas folhas, refletindo em maiores valores de leitura SPAD (BULLOCK; ANDERSON, 1998).

Figura 7 - Valor SPAD nas lâminas de folhas recém-expandidas no primeiro (A) e segundo (B) crescimentos do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Lavres Junior e Monteiro (2006) e Megda (2009), respectivamente, estudaram os capins aruana e marandu, e mostraram que o valor máximo de leitura SPAD nesses capins está entre 50 e 55 unidades. As doses de nitrogênio responsáveis por esses valores estiveram entre 29 e 33 mmol L⁻¹.

Viana et al. (2014) estudaram a nutrição do capim tanzânia e encontraram máximo valor SPAD de 48,95 com o fornecimento de nitrogênio de 800 kg ha⁻¹. Bravin e Oliveira (2014) estudaram adubação nitrogenada e também encontraram valores de 48 unidades SPAD para o capim xaraés com a utilização de nitrogênio de 150 kg ha⁻¹. Os valores máximos encontrados nesses estudos foram acima das médias de leitura encontradas no presente estudo.

De forma geral, avaliações indiretas da clorofila tem mostrados que no segundo período de crescimento das plantas são encontrados valores SPAD menores do que no primeiro crescimento. Isto foi relatado por Premazzi e Monteiro (2002) para o capim tifton 85, Manarin e Monteiro (2002) para o capim mombaça e Lavres Junior e Monteiro (2006) para o capim aruana. Diferindo dos resultados encontrados nesse trabalho que não apresentam diferença para os valores de leitura SPAD entre os períodos de crescimento (Figura 7).

Nas variáveis produtivas (como valor de área foliar e produção de massa seca, por exemplo) não foram verificadas diferenças entre as doses de nitrogênio de

15 e 27 mmol L⁻¹, porém, para os valores de leitura SPAD, tanto no primeiro quando no segundo período de crescimento do capim, foram observadas diferenças entre essas duas doses de nitrogênio. Neste caso, o aumento no conteúdo de clorofila não resultou em maior produtividade das plantas.

4.2.2 Concentração de nitrogênio total

4.2.2.1 Folhas diagnósticas

A concentração de nitrogênio quantificada nas folhas diagnósticas (LR) coletadas no primeiro corte do capim tanzânia não apresentou variação significativa para a concentração de nitrogênio total. Para o material coletado no segundo corte foi observada significância para interação doses de nitrogênio × proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ para essa concentração de nitrogênio total nas LR (Tabela 5).

As maiores concentrações de nitrogênio total foram obtidas no segundo corte das plantas nas doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹, com proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60, e representam incremento de 1,4 e 2,0 vezes, respectivamente, em relação às combinações de 100/0 e 70/30 de NO₃⁻/NH₄⁺ nas mesmas doses de nitrogênio.

A proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 proporcionou mais clara distinção entre as doses de nitrogênio, em relação às demais proporções estudadas. O acréscimo em concentração de nitrogênio nas LR, da dose de nitrogênio de 3 para 27 mmol L⁻¹, foi de 232%, na proporção de de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 (Tabela 5).

Santos Junior (2001) encontrou concentrações de nitrogênio de 15,49; 37,07 e 39,36 g kg⁻¹ nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim marandu cultivado com as doses de nitrogênio de 2, 15 e 27 mmol L⁻¹, respectivamente.

Tabela 5 – Concentração de nitrogênio total nas lâminas recém-expandidas do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
	-----g/kg-----		
3	21,14 aA	16,33 aB	20,87 aC
15	23,52 bA	22,35 aAB	32,44 aB
27	23,86 bA	30,29 bA	48,51 aA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Bastos (2012) estudou a concentração de nitrogênio total nas folhas diagnósticas de capim xaraés e encontrou valor máximo de 24,88 g kg⁻¹ de nitrogênio na combinação de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹ com a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0. Esse resultado é semelhante ao encontrado no presente trabalho para a mesma combinação de doses de nitrogênio com a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Tabela 5).

O fornecimento da dose de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹ resultou na maior concentração de nitrogênio nas folhas diagnósticas das plantas de capim tanzânia na média das três proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Bonfim-Silva e Monteiro (2010) encontraram, valor máximo de concentração de nitrogênio de 30,99 g kg⁻¹ nas folhas diagnósticas do capim braquiária na maior das quatro doses de nitrogênio estudadas (400 mg dm⁻³).

Werner et al. (1996) apresentaram faixas adequadas para nove capins tropicais considerados importantes para o estado de São Paulo, e relataram ampla variação das faixas descritas para a maioria dos nutrientes. Para a concentração de nitrogênio na parte aérea das gramíneas a faixa de variação foi de 12 a 20 g kg⁻¹. No presente estudo, com exceção da dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹, para as demais doses foram constatadas concentrações de nitrogênio nas LR mais elevadas do que a máxima sugerida por estes autores. Volpe et al. (2008) aplicaram doses de nitrogênio (0, 100, 200 e 300 kg ha⁻¹) para o capim massai e, mesmo na dose 0, obtiveram concentração de nitrogênio nas LR maior que 20,0 g kg⁻¹, que muito provavelmente não é limitante ao desenvolvimento desse capim. Nesse sentido, Monteiro apresentou palestra no Simpósio de 2005 e publicou Tabela sobre concentrações de nutrientes nas LR de tanzânia.

4.2.2.2 Demais partes (DP)

Para a concentração de nitrogênio total o material foi separado em demais partes (DP) da parte aérea (Figuras 8 e 9, Tabela 6) e raízes (Figura 10).

Para o material vegetal coletado no primeiro corte das plantas de capim tanzânia, as doses de nitrogênio e as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva apresentaram significância isoladamente para a concentração de nitrogênio total no conjunto dos componentes da parte aérea da gramínea (Figuras 8 e 9). O material coletado no segundo corte das plantas resultou em interação significativa das doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, o resultado dessa interação é mostrado na Tabela 6.

Para as doses de nitrogênio, a concentração de nitrogênio nas demais partes da planta variou de 14,43 a 23,18 g kg⁻¹. O aumento no suprimento de nitrogênio resultou em incremento de 1,61 vezes, quando se comparou a menor com a maior dose de nitrogênio. A influência do suprimento de nitrogênio na concentração de nitrogênio total em tecidos vegetais é bem reportada na literatura (COSTA et al., 2008; GARCEZ, 2009; COSTA et al., 2015). Quando há elevação no fornecimento de nitrogênio às plantas, a concentração de nitrogênio é aumentada, podendo ultrapassar a dose que resulta na máxima produção de massa seca (WHITEHEAD, 2000).

Figura 8 – Concentração de nitrogênio total (Nt) nas demais partes (DP) da parte aérea de capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte das plantas, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Figura 9 - Concentração de nitrogênio total (Nt) nas demais partes (DP) da parte aérea de capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte das plantas, em função das proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Santos, De Bona e Monteiro (2013) relataram que a concentração de nitrogênio foi alterada pela proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva e obtiveram valores de 13,5 e 24,0 g kg^{-1} para o capim aruana, os quais estão muito próximos aos encontrados no presente estudo. Os mesmos autores concluíram que plantas forrageiras cultivadas em solução nutritiva com elevada proporção de NH_4^+ resultaram em maior concentração de nitrogênio total. Também no presente estudo, os demais componentes da parte aérea que apresentaram maior concentração de nitrogênio total foram aqueles cultivados na proporção contendo mais NH_4^+ (40/60).

Cabral et al. (2013) estudaram a adubação nitrogenada (0; 100; 200; 300 e 400 mg dm^{-3}) nos capins convert (*Brachiaria hybrida* cv. mulato II), marandu e decumbens (*Brachiaria decumbens* cv. basilisk) e encontraram concentração de nitrogênio total de 19,98 a 35,45 g kg^{-1} .

Em relação ao material coletado no segundo corte, dentro de qualquer das três doses de nitrogênio, a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60 foi a que resultou em demais partes das plantas com as maiores concentrações de nitrogênio total. Com o incremento do NH_4^+ na proporção da solução nutritiva, houve incremento de 1,29, 1,55 e 1,74 vezes na concentração de nitrogênio total quando foram comparadas as

proporções de 100/0 (sem NH_4^+) com a que continha maior proporção de NH_4^+ de (40/60), nas doses de nitrogênio de 3, 15 e 27 mmol L^{-1} , respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração de nitrogênio total nas DP das plantas de capim tanzânia na ocasião do segundo corte, em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Dose de N (mmol L^{-1})	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
	-----g/kg-----		
3	12,78 aB	12,18 aB	16,61 aC
15	16,25 bAB	19,87 bA	25,17 aB
27	20,33 bA	20,69 bA	35,47 aA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

No processo de absorção e assimilação de nitrogênio, as plantas gastaram de menos energia para absorver e assimilar o NH_4^+ do que o NO_3^- . Dessa forma, as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ que tiveram maior participação do NH_4^+ no meio de cultivo resultaram em maior absorção de nitrogênio e consequentemente ocorreu aumento na concentração desse nutriente nos tecidos vegetais. Em concordância com os resultados do presente estudo, Ali et al. (2001) observaram que plantas de cevada cultivadas exclusivamente com nitrogênio amoniacal apresentaram maior concentração de nitrogênio na parte aérea do que plantas nutridas com alguma proporção de NO_3^- ou exclusivamente com a forma nítrica. Bastos (2012) estudou as doses de nitrogênio 3, 15 e 27 mmol L^{-1} , com proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0; 85/15 e 30/70, para o capim xaraés e constatou maior concentração de nitrogênio na parte aérea das plantas cultivadas na maior proporção de NH_4^+ (30/70).

Também Cao et al. (2011) que, avaliando o crescimento de plantas de azevém perene nas proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 e 0/100, verificaram que a concentração de nitrogênio na parte aérea foi maior quando ocorreu fornecimento exclusivo de NH_4^+ no meio de cultivo, mas foi menor nas proporções com mais de 50% de NO_3^- .

O aumento na concentração de nitrogênio em resposta à adubação nitrogenada ocorre devido à elevada concentração externa de nitrogênio. Os carregadores de baixa afinidade não são sujeitos à regulação, o que pode implicar

em excesso de nitrogênio na planta, que é armazenado nos vacúolos na forma de NO_3^- (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

Em relação ao sistema radicular, apenas a variável doses de nitrogênio apresentou significância para a concentração de nitrogênio total (Tabela 10). Não foi constatada diferença estatística para a concentração de nitrogênio total para as doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L^{-1} . Entretanto, o incremento de nitrogênio na solução nutritiva de 15 e 27 mmol L^{-1} resultou no aumento de 1,55 vezes na concentração de nitrogênio no sistema radicular das plantas de capim tanzânia variando de 13,20 a 20,51 g kg^{-1} (Figura 10), quando se comparou a dose de nitrogênio de 3 mmol L^{-1} com a dose de 27 mmol L^{-1} .

Batista e Monteiro (2006) relataram que a concentração de nitrogênio nas raízes de capim marandu apresentou valores de 2,4 a 29,5 g kg^{-1} mediante variação no fornecimento de nitrogênio (0, 100, 200, 300 e 400 mg dm^{-3}). Bastos (2012) encontrou valor máximo de concentração de nitrogênio nas raízes do capim xaraés de 16 g kg^{-1} na mais alta dose de nitrogênio (27 mmol L^{-1}), o que é inferior ao encontrado no presente estudo para a mesma dose.

Figura 10 - Concentração de nitrogênio total (Nt) nas raízes de capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Artur (2010) verificou que o suprimento de doses de nitrogênio alterou a concentração de nitrogênio total nas raízes do capim marandu, sendo que a mais alta dose de nitrogênio aplicada (400 mg dm^{-3}) aumentou em 3,3 vezes a concentração do nutriente, em relação à não aplicação no solo. Para Colozza et al.

(2000), a concentração de nitrogênio nas raízes de capim aruana aumentou linearmente com o incremento das doses de nitrogênio. Segundo esses autores, as raízes das plantas podem funcionar como órgão armazenador de nitrogênio, em ambiente com alta disponibilidade desse nutriente.

4.2.3 Concentração de nitrato e amônio nos tecidos vegetais

O material vegetal coletado no primeiro corte das plantas de capim tanzânia não apresentou interação significativa das doses de nitrogênio x proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ para as concentrações de NO_3^- e de NH_4^+ nos componentes da parte aérea (LR e DP) da gramínea, também não foi verificada significância das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ separadamente. Por outro lado, o material vegetal coletado no segundo corte das plantas resultou em significância das doses de nitrogênio na concentração de nitrato nas DP (Figura 11), e significância da interação doses de nitrogênio x proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva para a concentração de NH_4^+ nas DP (Tabela 7) do capim tanzânia. Nas raízes das plantas também não foi observada variação significativa nas concentrações de nitrato ou amônio em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$.

A concentração de nitrato nas DP da parte aérea do capim tanzânia variou de 1056 a 2357 mg kg^{-1} . Não foi constatada diferença significativa entre as doses de nitrogênio de 3 e 15 mmol L^{-1} para a concentração de nitrato nas DP. A mais alta dose de nitrogênio resultou em DP com maior concentração de nitrato (Figura 11). O aumento do suprimento de nitrogênio incrementou em 1,8 e 2,2 vezes a concentração de nitrato nas DP, quando foram comparadas as doses de nitrogênio de 3 e 15 mmol L^{-1} com a dose de 27 mmol L^{-1} , respectivamente.

Figura 11 - Concentração de nitrato (NO_3^-) nas demais partes (DP) da parte aérea de capim tanzânia, na ocasião do segundo corte das plantas, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

De maneira geral, a maior parte do nitrogênio nos tecidos da planta está na forma orgânica, enquanto uma pequena parte é encontrada na forma iônica tanto de nitrato quanto amônio. Entretanto, quando o nitrato é a principal forma de nitrogênio fornecido para a planta, a concentração de nitrogênio no tecido vegetal na forma de nitrato mesmo que baixa, pode ser indicadora se o fornecimento desse nutriente está adequado para as gramíneas forrageiras (WHITEHEAD, 2000).

Santos, De Bona e Monteiro (2013) fixaram a dose de nitrogênio fornecida às plantas de capim aruana em 15 mmol L^{-1} e encontraram valores de 450 a 580 mg kg^{-1} para a concentração de nitrato na parte aérea, quando as plantas foram supridas exclusivamente com NO_3^- (100/0) ou quando a presença do NO_3^- na proporção era alta (85/15), respectivamente.

As concentrações de amônio encontradas na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60 foram mais altas à medida em que se elevou a dose de nitrogênio de 3 para de 15 e para 27 mmol L^{-1} . A faixa de variação na concentração de amônio nas DP foi ampla, (de 412 a 3014 mg kg^{-1}) e esses limites ocorreram na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60 na solução nutritiva e resultaram em incremento de 7,31 vezes na concentração de amônio nas DP do capim tanzânia, quando se comparou a dose de nitrogênio de 3 mmol L^{-1} com a de 27 mmol L^{-1} (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentração de amônio (NH_4^+) nas DP de capim tanzânia em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ no segundo período de crescimento das plantas

Dose de N (mmol L ⁻¹)	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
	-----mg kg ⁻¹ -----		
3	2186 aA	1080 abA	412 bC
15	1321 bA	1612 abA	2753 aB
27	1895 bA	1204 bA	3013 aA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

É importante ressaltar que, mesmo com o fornecimento de nitrogênio exclusivamente na forma de NO_3^- , a presença do amônio nas DP (componente da parte aérea das plantas) pode ser explicada pela redução do nitrato ocorrida no interior das plantas, com a consequente formação de amônio, ou pela formação de amônio em processos fisiológicos das plantas, como a fotorrespiração (FERNANDES; SOUZA, 2006).

A dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ proporcionou maior concentração de amônio nas DP na combinação em que a forma amoniacal não foi fornecida as plantas (100/0). Em situações com alto fornecimento de nitrogênio na forma de NH_4^+ no meio de cultivo e em presença de baixa disponibilidade de esqueletos carbônicos, ocorre dificuldade de assimilação do amônio, o que resulta em alta concentração dessa forma de nitrogênio no tecido vegetal.

Com exceção da dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹, o fornecimento de nitrogênio na forma de NH_4^+ resultou em incremento de 2,1 e 1,6 vezes, respectivamente, na concentração de amônio nas DP quando se comparou com o não fornecimento com a maior proporção de NH_4^+ na solução nutritiva (Tabela 7).

Santos, De Bona e Monteiro (2013) encontraram valores de 380 a 580 mg kg⁻¹ para a concentração de amônio na parte aérea do capim aruana, os quais foram valores bem inferiores aos encontrados no presente estudo, com exceção da dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60 que apresentou valor dentro da faixa encontrada por esses autores.

As plantas crescidas nas doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L⁻¹ com proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60, foram visivelmente bem mais vigorosas do que as plantas crescidas na mesma proporção e na dose de 3 mmol L⁻¹. É possível que o

amônio contido nas DP tenha sido convertido mais eficazmente em aminoácidos e, conseqüentemente em proteínas, o que se culminou em maior crescimento vegetal, contabilizado pelo maior número de perfilhos e de folhas e maiores área foliar e produção de massa seca do capim tanzânia.

4.3 Enzimas incorporadoras de nitrogênio

4.3.1 Atividade da redutase do nitrato

A análise dos resultados referentes à atividade da enzima redutase do nitrato revelou a significância para a interação doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ nas amostras coletadas no primeiro período de crescimento do capim tanzânia (Tabela 8). O material vegetal coletado no segundo corte das plantas não apresentou diferença estatística para as doses de nitrogênio ou proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$.

Mediante o fornecimento de nitrogênio na dose de 27 mmol L^{-1} foi constatada diferença estatística entre as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 as plantas do capim mostraram maior atividade da redutase do nitrato do que nas demais proporções. Essa atividade teve incremento de 2,4 vezes quando se comparou a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 com a de 40/60 (Tabela 8).

A proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 70/30 não diferiu da 40/60 em qualquer das doses de nitrogênio. Entretanto, dentro da proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0, as doses de nitrogênio de 3 e 27 mmol L^{-1} tiveram diferença na atividade dessa enzima. Nessa proporção, o aumento da atividade da enzima foi de 2,1 vezes, quando se comparou a dose de nitrogênio de 3 mmol L^{-1} com a dose de 27 mmol L^{-1} .

Tabela 8 - Atividade da enzima redutase do nitrato, determinada *in vivo*, nas folhas diagnósticas (LR), durante o primeiro crescimento do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Nitrogênio (mmol L^{-1})	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
	----- $\mu\text{mol de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g MF}^{-1}$ -----		
3	1,68 aB	1,71 aA	2,29 aA
15	2,44 aAB	1,56 aA	2,56 aA
27	3,51 aA	2,07 bA	1,46 bA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

A enzima redutase do nitrato catalisa o primeiro passo da redução do nitrato nas plantas, atuando na redução do NO_3^- a NO_2^- (nitrito) (YANEVA; BAYDANOVA; VUNKOVA-RADEVA, 2000). De acordo com Galangau, Daniel-Vedele e Moureaux (1988) e Vincentz, Moureaux e Leydecker (1993) a atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas e raízes das plantas é induzida pela presença de NO_3^- no substrato.

Machado et al. (2014) estudaram a produtividade da cultura do milho com doses de nitrogênio (0, 60, 90, 120, e 150 kg ha⁻¹) e relataram menor atividade dessa enzima com a diminuição na absorção de NO_3^- .

Era esperado que a atividade da enzima redutase do nitrato fosse induzida pelo aumento na proporção de NO_3^- e consequente redução na proporção de NH_4^+ na solução nutritiva, como reportado por diversos autores para várias espécies de plantas como *Arabidopsis thaliana* (HELALI et al., 2010), morango (*Fragaria × ananassa* var. Camarosa) (TABATABAEI; YUSEFI; HAJILOO, 2008), berinjela (*Solanum melangela*) (CLAUSSEN, 1986).

Devido a importância de seu papel regulador (assimilação do nitrogênio), a atividade da enzima redutase do nitrato pode estar relacionada, indiretamente, com a produtividade das culturas (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Isso com fundamento em que plantas com alta atividade da enzima redutase de nitrato teriam maior capacidade de assimilar o NO_3^- disponível e, em decorrência, maior capacidade em responder à adubação nitrogenada (BEEVERS; HAGEMAN, 1969). Essa fundamentação foi confirmada no presente estudo, uma vez que plantas crescidas nas maiores proporções de NO_3^- (100/0 e 70/30) no meio de cultivo, resultaram em maiores TAF, área foliar e consequentemente, maior produção de massa seca, quando comparadas às plantas que receberam maior proporção de NH_4^+ (40/60).

4.3.2 Atividade da glutamina sintetase

Foi constatada significância das doses de nitrogênio × proporções de NO_3^- / NH_4^+ para a atividade da enzima glutamina sintetase, na ocasião dos dois cortes do capim tanzânia. Em ambos os cortes foram constatados aumento da atividade da enzima quando houve acréscimo da proporção de NH_4^+ , independente da dose de nitrogênio fornecida na solução nutritiva (Tabela 9).

Tanto no material vegetal analisado no primeiro quanto no segundo corte, as plantas desenvolvidas nas três doses de nitrogênio estudadas com proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 e 70/30 não apresentaram diferença estatística. Entretanto, na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60, foi constatada diferença estatística entre as doses de nitrogênio na ocasião das duas coletas de tecidos (Tabela 9).

No primeiro corte da gramínea forrageira, foram observados aumentos de 3,4, 1,6 e 2,2 vezes na atividade dessa enzima, nas doses de nitrogênio de 3, 15 e 27 mmol L^{-1} , respectivamente, quando se comparou a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 com a proporção de 40/60.

Para o material vegetal coletado no segundo corte das plantas também foi constatado aumento da atividade da enzima glutamina sintetase com o fornecimento das proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva. Nesse caso, o incremento de NH_4^+ resultou em aumento da atividade enzimática de 2,26, 2,41 e 2,59 vezes nas doses de nitrogênio de 3, 15 e 27 mmol L^{-1} respectivamente, quando foi comparada a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 com a de 40/60.

Tabela 9 - Atividades da enzima glutamina sintetase (GS) nas folhas diagnósticas (LR) do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio x proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Nitrogênio (mmol L^{-1})	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
----- $\mu\text{mol de } \gamma\text{-glutamilhdroxamato g MF}^{-1}\text{h}^{-1}$ -----			
-----1º Corte-----			
3	2,72 bA	2,13 bA	9,19 aA
15	2,35 bA	2,61 bA	5,07 aB
27	1,99 bA	2,11 bA	4,40 aB
-----2º Corte-----			
3	2,27 bA	2,21 bA	5,13 aB
15	1,61 bA	2,06 bA	3,88 aB
27	2,73 bA	1,64 bA	7,04 aA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

A principal rota de assimilação do nitrogênio amoniacal (NH_4^+) nas plantas ocorre por meio da atividade da enzima glutamina sintetase, que ocorre em diversas isoformas e localizações nas plantas (HIREL et al., 1984). No presente experimento foi verificada maior atividade dessa enzima quando foi colocada maior participação de NH_4^+ no fornecimento de nitrogênio no meio de crescimento das plantas.

Carneiro (2014) estudou a fisiologia de plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis*), em função de doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Relatou aumento na atividade da enzima glutamina sintetase quando houve maior disponibilidade de NH_4^+ no meio.

Os resultados da atividade da enzima glutamina sintetase nesse capim estão de acordo com a literatura. Garcez (2013) estudou cultivares de *Panicum* e *Brachiaria* em relação ao uso eficiente do nitrogênio e reportou maior atividade da enzima glutamina sintetase nas plantas de *Panicum* (mombaça e aruana). Também acrescentou que a alta atividade dessa enzima pode estar relacionada ao rápido transporte do nitrogênio nessa forma (NH_4^+), à redução do NO_3^- absorvido a NH_4^+ pela enzima nitrato redutase e/ou ao consumo de compostos nitrogenados (desaminação da asparagina, por exemplo), liberando NH_4^+ nas lâminas recém-expandidas dos capins.

Mokhele et al. (2012) relatou que, em plantas de *Arabidopsis*, o NH_4^+ é originado da redução do NO_3^- , da direta absorção, da fotorespiração e da fixação gasosa. Segundo Ruiz, Rivero e Romero (2007), toda forma de nitrogênio inorgânico sofre primeiro redução a NH_4^+ , pois é a única forma reduzida disponível para as plantas usarem na assimilação de aminoácidos de transporte. A mais alta atividade da enzima glutamina sintetase foi obtida na condição em que maior concentração de NH_4^+ na solução nutritiva foi disponibilizada para as plantas.

4.4 Estresse oxidativo

4.4.1 Indicadores de estresse

4.4.1.1 Malondialdeído (MDA)

Para a concentração de malondialdeído (MDA) nos componentes da parte aérea (LR, DL e C+B) nas plantas de capim tanzânia, coletados na ocasião do primeiro corte, não foi constatada significância para as doses de nitrogênio, proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ou para a interação dos mesmos para a concentração de MDA. Entretanto, nas determinações no material vegetal coletado no segundo corte das plantas, foi verificada significância para a interação doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em termos da concentração de MDA nas LR, DL e raízes do capim tanzânia.

Nas LR das plantas crescidas sob a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹, nas proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ de 100/0, 70/30 e 40/60 não diferiram estatisticamente entre si.

Ao analisar as LR das plantas que receberam a dose de nitrogênio de 15 mmol L⁻¹, pode-se verificar que a concentração de MDA foi maior na proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 do que na de 100/0 e correspondeu ao incremento de 3,74 vezes nessa concentração entre as proporções.

O material vegetal coletado das plantas crescidas sob a dose de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹ apresentou maior concentração de MDA na proporção NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 com incremento de 2,54 vezes em relação a proporção sem NH₄⁺ (100/0).

Tabela 10 - Concentração de malondialdeído (MDA) na massa fresca (MF) dos componentes (LR e DL) da parte aérea coletados no segundo corte e nas raízes do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO₃⁻ e NH₄⁺

Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	Proporções de NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
-----µmol/g/MF-----			
-----LR-----			
3	28,38 aA	34,95 aA	19,15 aB
15	10,63 bA	26,56 abA	39,84 aAB
27	22,09 bA	24,35 bA	56,05 aA
-----DL-----			
3	42,91 aA	17,47 aA	17,61 aB
15	29,22 aA	39,98 aA	37,46 aAB
27	28,38 bA	28,93 bA	63,18 aA
-----RAÍZES-----			
3	10,48 aA	3,91 aB	7,55 aA
15	16,36 aA	6,71 aB	10,90 aA
27	14,96 bA	31,03 aA	7,13 bA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de NO₃⁻/NH₄⁺

Nas DL das plantas que se desenvolveram sob as doses de nitrogênio de 3 e 15 mmol L⁻¹, nas proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ de 100/0, 70/30 e 40/60, não diferiram estatisticamente entre si. Possivelmente, a alta atividade da enzima glutamina sintetase nas plantas de capim tanzânia (Tabela 9) tenha sido responsável pela menor produção da concentração de MDA nessas condições, incorporando o amônio e evitando os efeitos deletérios causados pelo excesso desse cátion.

Nas DL das plantas nutridas com a dose de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹, resultaram em aumento da concentração de MDA, conforme se aumentou a proporção de NH₄⁺ na solução nutritiva. Notou-se incremento de 2,23 vezes no conteúdo de MDA na dose de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹ quando se comparou a proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 com a de 100/0.

Para as raízes das plantas de capim tanzânia, não foi verificada diferença estatística para a concentração de MDA nos tratamentos com doses de nitrogênio de 3 e 15 mmol L⁻¹, em nenhuma das três proporções de NO₃⁻/NH₄⁺.

As raízes de plantas crescidas na dose de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹ tiveram a mais alta concentração de MDA na proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 70/30, o que foi 4,35 vezes maior nessa proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ do que na de 40/60.

As plantas possuem um complexo sistema antioxidante (que pode ser enzimático ou não), que atenua as injúrias causadas pelo excesso de EROs. Os danos na membrana ocorrem em decorrência da peroxidação de lipídios provocada pelo excesso de EROs, em situações de estresse oxidativo (SILVEIRA et al., 2005; HARIR; MITLLER, 2009). A geração de EROs pode ser aumentada por fatores abióticos como: seca, metais pesados, elevadas concentrações de sais, extremos de temperatura, radiação UV e excesso de NH₄⁺ (BHATTACHARJEE, 2005).

Zhao (2011) avaliou o efeito do fornecimento de cádmio (0,08; 0,89 e 8,92 μmol L⁻¹) para o sistema antioxidante de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) e de milho e relatou que a concentração de MDA nessas duas culturas aumentou de forma linear com a elevação das doses de cádmio.

Viudes e Santos (2014) analisaram o efeito do estresse salino (0, 100 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl) em plantas de artemísia (*Artemisia annua*) e verificaram aumento de 81,70% na concentração de MDA nas plantas que receberam a dose máxima de NaCl (200 mmol L⁻¹), em relação ao tratamento controle.

Os resultados desses estudos com trigo, milho e Artemísia comprovam a alta produção de MDA nas condições de estresse a que essas plantas foram submetidas, de forma similar ao verificado no presente experimento mediante o fornecimento de nitrogênio de 27 mmol L⁻¹ e empregando a proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 (ou seja, alta participação de NH₄⁺ no suprimento de nitrogênio).

4.4.1.2 Peróxido de hidrogênio

Para a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no capim tanzânia foi significativa a interação doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apenas para o componente CB da parte aérea na ocasião do primeiro corte das plantas (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos colmos+bainhas (CB) coletados no primeiro corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+

Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
----- $\mu\text{mol/gMF}$ -----			
-----CB-----			
3	785,92 aA	556,38 aA	221,61 bB
15	128,42 bB	55,30 bB	533,70 aAB
27	514,63 aA	109,36 bB	628,33 aA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Na menor dose de nitrogênio, a concentração de H_2O_2 não apresentou diferença estatística nas proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 e 70/30, porém diminuiu com o maior fornecimento de NH_4^+ na solução nutritiva (40/60). A proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60 apresentou 3,55 vezes concentração de H_2O_2 em relação ao não fornecimento de NH_4^+ às plantas. Assim como no caso do MDA (Tabela 10), provavelmente a alta atividade da enzima glutamina sintetase nas plantas de capim tanzânia (Tabela 9) tenha sido responsável pela diminuição da concentração de H_2O_2 em condição de fornecimento de baixa dose de nitrogênio (3 mmol L⁻¹) e proporção $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 40/60.

Com a aplicação da dose de nitrogênio de 15 mmol L⁻¹, observou-se aumento da concentração de H_2O_2 com a elevação da proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 70/30 para 40/60 na solução nutritiva. Quando se comparou a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 70/30 com a de 40/60, observou-se na dose de 15 mmol L⁻¹ incremento de 9,64 vezes na concentração de H_2O_2 .

Foi constatada diminuição de 5,74 vezes na concentração de H_2O_2 na dose de 27 mmol L⁻¹ na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 70/30, quando comparada com a proporção de 40/60 (Tabela 11).

Jiao et al. (2014) estudaram o papel do ácido fusárico na morte programada das células e encontraram maior concentração de H_2O_2 em células de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) que permaneceram mais tempo em condição de estresse por esse ácido. Assim como neste estudo, a maior concentração de H_2O_2 foi encontrada em plantas que estiveram expostas aos extremos dos tratamentos (menor e maior dose de nitrogênio e fornecimento apenas da forma nítrica de nitrogênio; maior dose de nitrogênio e maior proporção de NH_4^+ na solução nutritiva), que resultaram nos mais altos níveis de estresse.

Deuner et al. (2008) analisaram o efeito da aplicação de H_2O_2 na atividade de enzimas do sistema antioxidante em mudas de café (*Coffea arabica*) e relataram que a concentração de H_2O_2 foi maior após 2 horas de aplicação do peróxido. Como resultado ocorreu o fechamento dos estômatos e houve diminuição da taxa transpiratória dessas mudas sendo, portanto, outra consequência do estresse oxidativo.

4.5 Sistema antioxidante

4.5.1 Atividade da catalase (CAT)

Na atividade da enzima catalase (CAT) nos componentes da parte aérea do capim tanzânia foi constatada significância para as doses de nitrogênio e proporções de NO_3^-/NH_4^+ isoladamente (Figuras 12, 13, 14 e 15) na ocasião dos dois cortes das plantas. Também ocorreu significância das doses de nitrogênio na atividade dessa enzima nas raízes das plantas (Figura 16).

Na ocasião do primeiro corte das plantas, os componentes que apresentaram significância para a atividade da catalase foram as DL e CB. As DL apresentaram mais alta atividade da enzima CAT na dose de nitrogênio de 27 do que em 15 $mmol L^{-1}$ (Figura 12), o que pode ter ocasionado a diminuição da concentração de MDA (Tabela 10). Nos CB a atividade da CAT foi maior na proporção de NO_3^-/NH_4^+ de 70/30 do que nas demais proporções (100/0 ou 40/60). A proporção de 70/30 pode ter sido primordial para evitar os danos causados pelo estresse oxidativo nos CB das plantas, uma vez que a CAT é a enzima responsável pela eliminação do H_2O_2 nas células (Tabela 11). Essa enzima catalisa a conversão de duas moléculas de H_2O_2 em água e O_2 pela transferência de dois elétrons (ZENG et al., 2010).

A atividade da CAT foi 4,21 vezes maior nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) na condição de fornecimento de nitrogênio de 15 mmol L⁻¹ do que com 3 mmol L⁻¹ (Figura 14).

As proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ também resultaram em variação significativa na atividade da enzima CAT nas LR do capim tanzânia, com a mais alta atividade dessa enzima sendo obtida na proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 (Figura 15). O emprego da proporção com maior participação de NH₄⁺ (40/60) determinou incremento de 4,18 vezes na atividade da CAT quando foi comparado à proporção de 100/0 (somente aplicação da forma nítrica de nitrogênio).

Deuner et al. (2008) relataram que a atividade da CAT foi aumentada pela aplicação do H₂O₂ em mudas de cafeeiro. Carneiro et al. (2015) estudaram o metabolismo antioxidante em plantas jovens de seringueira cultivadas sob fontes de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺) e observaram maior atividade de CAT nas plantas cultivadas com NH₄⁺ (proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ 0/8 mmol L⁻¹). Esse resultado está de acordo com os encontrados neste estudo, uma vez que a maior atividade da CAT foi obtida nas plantas que tiveram a maior participação do NH₄⁺ no fornecimento de nitrogênio (Figura 15).

Figura 12 - Atividade da enzima catalase (CAT) nas demais lâminas foliares (DL) das plantas de capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Figura 13 - Atividade da enzima catalase (CAT) nos colmos+bainhas (CB) das plantas de capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das proporções NO₃⁻/NH₄⁺. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Figura 14 - Atividade da enzima catalase (CAT) nas lâminas recém-expandidas (LR) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Figura 15 - Atividade da enzima catalase (CAT) nas lâminas recém-expandidas (LR) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das proporções $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

As raízes do capim tanzânia apresentaram maior atividade da CAT na dose de nitrogênio de 15 do que nas doses de 3 ou 27 mmol L^{-1} (Figura 16). Também Moro (2012) verificou que a redução na atividade da CAT em plantas que foram submetidas a estresse severo, pode estar relacionada ao fato do H_2O_2 produzido ser mais consumido em processos oxidativos (como na peroxidação de lipídios), do que eliminado do metabolismo pela ação de enzimas antioxidantes.

Figura 16 - Atividade da enzima catalase (CAT) nas raízes do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

4.5.2 Atividade da glutathione redutase (GR)

Nas amostras de tecido vegetais coletadas no primeiro corte do capim tanzânia, para a atividade da enzima glutathione redutase (GR) foi significativa a interação das doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ para as DL (Tabela 12), assim como ocorreu significância das doses de nitrogênio para os CB (Figura 17). No material vegetal do segundo corte das plantas, obteve-se significância da interação das doses de nitrogênio $\times$ proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ para as LR do capim tanzânia (Tabela 13).

As DL das plantas crescidas sob a dose de nitrogênio de 3 mmol L^{-1} apresentaram maior atividade da enzima GR na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 do que nas proporções 70/30 e 40/60. Em relação ao não fornecimento da forma amoniacal às plantas, notou-se incremento de 2,73 vezes na atividade dessa enzima, quando foi fornecida a maior proporção de NH_4^+ (40/60). Nas doses de nitrogênio de 15 e 27 mmol L^{-1} , foi possível observar aumento de 2,3 vezes na atividade da GR na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60 quando comparada com a proporção de 70/30, sendo que nesta proporção foi obtida a menor atividade dessa enzima (Tabela 12).

Tabela 12 - Atividade da enzima glutathione redutase (GR) nas demais lâminas foliares (DL) do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Nitrogênio (mmol L^{-1})	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
	----- $\mu\text{mol GSSH min/mg prot}$ -----		
3	0,041 aA	0,017 bA	0,015 bB
15	0,024 abAB	0,017 bA	0,039 aA
27	0,023 abB	0,015 bA	0,035 aA

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Figura 17 - Atividade da enzima glutathione redutase (GR) nos colmos+bainhas CB do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio. Letras diferentes mostram diferença entre as médias, pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Em relação aos CB das plantas de capim tanzânia, a faixa de variação da atividade da enzima GR foi de 0,005 a 0,026 $\mu\text{mol GSSH min mg}^{-1}$ proteína. A maior atividade da GR nos CB do capim foi obtida encontrada na dose de nitrogênio de 27 mmol L^{-1} (que diferiu significativamente da atividade avaliada na dose de nitrogênio de 3 mmol L^{-1}) e pode estar relacionada com a diminuição dos danos causados pelo estresse oxidativo nas plantas que receberam essa dose de nitrogênio. A GR é considerada a enzima-chave no ciclo ascorbato-glutathione por proteger células contra os danos causados pelo estresse oxidativo e por reciclar o metabólito glutathione, quando oxidado (FOYER; NOCTOR, 2005).

Tabela 13 - Atividade da enzima glutathione redutase (GR) nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) do capim tanzânia na ocasião do segundo corte, em função das doses de nitrogênio e proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	Proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ na solução nutritiva		
	100/0	70/30	40/60
-----μmol GSSH min/mg prot.-----			
3	0,029 aA	0,009 aB	0,019 aB
15	0,014 bA	0,041 aA	0,060 aA
27	0,025 aA	0,026 aAB	0,032 aB

Médias seguidas de letra diferentes diferem entre si: minúsculas para as proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ dentro de cada dose de nitrogênio e maiúsculas para doses de nitrogênio dentro de cada proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

As LR das plantas crescidas sob a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹, não apresentaram diferença estatística para nenhuma das três proporções de NO₃⁻/NH₄⁺. Para as plantas que se desenvolveram com a dose de nitrogênio de 15 mmol L⁻¹, ocorreu aumento na atividade da GR com o aumento na participação do NH₄⁺ no fornecimento de nitrogênio. Na condição da proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60 a atividade da enzima GR foi 4,28 vezes maior do que a obtida na proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60.

Dentro da proporção de NO₃⁻/NH₄⁺ de 40/60, pode-se verificar que a dose de nitrogênio de 15 mmol L⁻¹, resultou em incremento de 3,16 e 1,90 vezes na atividade da enzima GR, em comparação dose com as doses de 3 e 27 mmol L⁻¹, respectivamente.

Deuner et al. (2008), estudando a ação de enzimas antioxidantes em mudas de cafeeiro, encontraram atividade elevada da GR quando as plantas foram pulverizadas com H₂O₂, mostrando eficiência da enzima na remoção das EROs quando há estresse oxidativo.

4.5.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) em gel de poliacrilamida em sistema não desnaturante

Para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi constatada que a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ apresentou maior intensidade na atividade dessa enzima em relação às demais doses de nitrogênio (Figuras 18 a 24).

A atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nos componentes (LR, DL e CB) da parte aérea do capim tanzânia, em ambos os cortes, mostrou regularidade no perfil de bandas ativas de SOD, apresentando sempre o mesmo número de bandas, mas diferenças na intensidade das mesmas. De maneira geral observou-se que, para as LR e DL, a atividade da enzima foi mais intensa nas proporções de NO₃⁻/NH₄⁺ de 100/0 e 40/60, nas amostras de tecidos vegetais coletados nos dois cortes das plantas. Em relação às doses de nitrogênio, para as proporções NO₃⁻/NH₄⁺ de 100/0 e 40/60, constatou-se maior atividade da enzima SOD nas doses de nitrogênio de 3 e 27 mmol L⁻¹, que também ocorreu no material amostrado em ambos os cortes.

Nos CB do capim tanzânia, observou-se diminuição da intensidade das bandas de SOD do primeiro para o segundo corte das plantas (Figuras 15 e 16). Isso

sugere que em condições de estresse oxidativo, no período de rebrotação do capim tanzânia, as partes da planta responsáveis pela remoção das EROs são as folhas, tanto as LR quanto as DL.

A enzima SOD é considerada como enzima chave na remoção do ânion superóxido e também é capaz de remover outras EROs. A SOD está presente em todos os compartimentos suscetíveis ao estresse oxidativo (por exemplo, cloroplastos e mitocôndrias) (BOWLER et al., 1992).

Em relação à atividade da SOD nas raízes do capim tanzânia, houve considerável aumento nas bandas da enzima em relação aos componentes da parte aérea (LR, DL e CB), que mostrou três bandas enquanto nas raízes foram observadas cinco bandas. É interessante notar que ocorreu indução de uma nova banda de SOD (Figura 24), provavelmente como tentativa de eliminar as EROs, uma vez que a dose de nitrogênio de 3 mmol L⁻¹ mostrou maior atividade da enzima em todos os componentes da planta.

O maior número de bandas de SOD no sistema radicular do capim, nas condições em que o experimento foi conduzido, sugere que a enzima SOD foi mais responsiva ao estresse oxidativo no sistema radicular do que na parte aérea das plantas.

Figura 18 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR) colhidas no primeiro corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ . As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas proporções de NO_3^- e NH_4^+ 100/0 (1), 70/30 (2) e 40/60 (3), seguindo a ordem das doses de nitrogênio 3 (A), 15 (B) e 27 (C) mmol L^{-1} . As setas indicam as bandas identificadas em PAGE

Figura 19 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR) colhidas no segundo corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ . As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas proporções de NO_3^- e NH_4^+ 100/0 (1), 70/30 (2) e 40/60 (3), seguindo a ordem das doses de nitrogênio 3 (A), 15 (B) e 27 (C) mmol L^{-1} . As setas indicam as bandas identificadas em PAGE

Figura 20 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante nas demais lâminas foliares (DL) colhidas no primeiro corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ . As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas proporções de NO_3^- e NH_4^+ 100/0 (1), 70/30 (2) e 40/60 (3), seguindo a ordem das doses de nitrogênio 3 (A), 15 (B) e 27 (C) mmol L^{-1} . As setas indicam as bandas identificadas em PAGE

Figura 21 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante nas demais lâminas foliares (DL) colhidas no segundo corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ . As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas proporções de NO_3^- e NH_4^+ 100/0 (1), 70/30 (2) e 40/60 (3), seguindo a ordem das doses de nitrogênio 3 (A), 15 (B) e 27 (C) mmol L^{-1} . As setas indicam as bandas identificadas em PAGE

Figura 22 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante nos colmos+bainhas (CB) colhidos no primeiro corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ . As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas proporções de NO_3^- e NH_4^+ 100/0 (1), 70/30 (2) e 40/60 (3), seguindo a ordem das doses de nitrogênio 3 (A), 15 (B) e 27 (C) mmol L^{-1} . As setas indicam as bandas identificadas em PAGE

Figura 23 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante nos colmos+bainhas (CB) colhidos no segundo corte do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ . As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas proporções de NO_3^- e NH_4^+ 100/0 (1), 70/30 (2) e 40/60 (3), seguindo a ordem das doses de nitrogênio 3 (A), 15 (B) e 27 (C) mmol L⁻¹. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE

Figura 24 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em PAGE não desnaturante nas raízes do capim tanzânia, em função das doses de nitrogênio e proporções de NO_3^- e NH_4^+ . As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas proporções de NO_3^- e NH_4^+ 100/0 (1), 70/30 (2) e 40/60 (3), seguindo a ordem das doses de nitrogênio 3 (A), 15 (B) e 27 (C) mmol L^{-1} . As setas indicam as bandas identificadas em PAGE

5 CONCLUSÕES

A utilização de nitrogênio na dose de 15 mmol L^{-1} , quando fornecida nas proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 ou 70/30, é suficiente para garantir alta produção de massa seca do de capim tanzânia.

Nas combinações de nitrogênio de 15 e 27 mmol L^{-1} com predomínio de NH_4^+ na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 40/60 na solução nutritiva ocorreu menor produção dos parâmetros morfogenéticos, com destaque para área foliar, massa seca de parte aérea e raízes.

Doses elevadas de nitrogênio (15 e 27 mmol L^{-1}) aumentam a atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase, além de elevar a concentração de NO_3^- e NH_4^+ na parte aérea das plantas.

O estresse oxidativo, indicado pelas concentrações de MDA e H_2O_2 , é intensificado com o fornecimento de nitrogênio de 27 mmol L^{-1} combinado com a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 40/60.

A alta disponibilidade de nitrogênio às plantas proporciona ativação ação das enzimas CAT e GR para serem mais eficazes na eliminação de EROs nas DL e CB da parte aérea das plantas.

A alta atividade da SOD induziu o aparecimento de uma nova banda da enzima, no sistema radicular do capim tanzânia, o que favoreceu a atenuação da concentração de MDA nas plantas que receberam proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 100/0 e 40/60.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J.B.R. **Níveis de nitrogênio e proporções de nitrato e amônio afetando produção, atividade da redutase do nitrato e composição de três gramíneas forrageiras**. 1994. 103 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- ADAMS, F. Nutritional imbalances and constraints to plant growth on acid soils. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 4, p. 81-87, 1981.
- ALEXANDRINO, E.; NASCIMENTO JR., D.; MOSQUIM, P.R.; REGAZZI, A.J.; ROCHA, F.C.; SOUZA, D.P. Características morfogênicas e estruturais na rebrotação da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a três doses de nitrogênio e frequências de corte. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, p. 17-24, 2005.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 24, p. 1337–1344, 2001.
- ALI, A.; TUCKER, T.C.; THOMPSON, T.L.; SALIM, M. Effects of salinity and mixed ammonium and nitrate nutrition on the growth and nitrogen utilization of barley. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 186, p. 223-228, 2001.
- 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.
- ANSLOW, R.C. The rate of appearance of leaves on tillers of the *gramineae*. **Herbage Abstracts**, Armidale, v. 36, n. 3, p. 149-155, 1966.
- ARTUR, A.G. **Adubações com nitrogênio e enxofre: frações no solo, características estruturais, nutricionais, produtivas e uso da água pelo capim-marandu**. 2010. 115 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BASSO, K.C.; CECATO, U.; LUGÃO, S.M.B.; GOMES, J.A.N.; BARBERO, L.M.; MOURÃO, G.B. Morfogênese e dinâmica do perfilhamento em pastos de *Panicum maximum* Jacq. cv. IPR-86 Milênio submetido a doses crescentes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 11, n. 4, p. 976-989, 2010.

BASTOS, C.E.A. **Formas e doses de nitrogênio nos aspectos morfogênicos, produtivos e nutricionais do capim-xaraés**. 2012. 95 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BATISTA, K. **Respostas do capim-marandu a combinações de doses de nitrogênio e enxofre**. 2002. 91 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BATISTA, K.; MONTEIRO, F.A. Sistema radicular do capim Marandu, considerando as combinações de doses de N e de enxofre. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 821-828, 2006.

BEAUCHAMP, C.H.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, p. 276-287, 1971.

BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, n. 1, p. 495-522, 1969.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 7, p. 1113-1121, 2005.

BLOOM, A.J.; BURGER, M.; ASENSIO, J.S.R.; COUSINS, A.B. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 328, p. 899-903, 2010.

BONFIM-DA-SILVA, E.M.; MONTEIRO, F.A. Nitrogênio e enxofre na adubação e em folhas diagnósticas e raízes do capim-braquiária em degradação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 1641-1649, 2010.

BOWLER, C.; MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVIN, M.P.; OLIVEIRA, T.K. Adubação nitrogenada em milho e capim-xaraés sob plantio direto e preparo convencional em sistema agrossilvipastoril. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 49, n. 10, p. 762-770, 2014.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BULLOCK, D.G.; ANDERSON, D.S. Evaluation of the Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for nitrogen management in corn. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, p. 741-755, 1997.

CABRAL, C.E.A.; BONFIM-SILVA, E.M.; BONELLI, E.A.; SILVA, T.J.A.; CABRAL, C.H.A.; SCARAMUZZA, W.L.M.P. Compactação do solo e macronutrientes primários na *Brachiaria brizantha* cv. Piatã e *Panicum maximum* cv. Mombaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, p. 362–367, 2012.

CABRAL, C.E.A.; ABREU, J.G.; BONFIM-SILVA, E.M.; CABRAL, C.H.A.; SCARAMUZZA.; SILVA, T.J.A. Eficiência de produção e concentração de nitrogênio nos capins marandu, decumbens e convert submetidos à adubação nitrogenada. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 29, n. 1, p. 1653-1663, 2013.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 83, p. 463-468, 1991.

CAO, H.; GE, Y.; LIU, D.; CAO, Q.; CHANG, S.X.; CHANG, J.; SONG, X.; LIN, X. Nitrate/ammonium ratios affect ryegrass growth and nitrogen accumulation in a hydroponic system. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 34, p. 206-216, 2011.

CARNEIRO, M.M.L.C. **Fisiologia de plantas jovens de seringueira cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas e sob baixa disponibilidade de água e oxigênio**. 2014. 108 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CARNEIRO, M.M.L.C.; GOMES, M.P.; SANTOS, H.R.B.; REIS, M.V.; MENDONÇA, A.M.C.; OLIVEIRA, L.E.M. Fotorrespiração e metabolismo antioxidante em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 10, n. 1, p. 66-73, 2015.

CHAPMAN, S.C.; BARRETO, H.J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, Madison, v. 89, p. 557-562, 1997.

CLAUSSEN, W. Influence of fruit load and environmental factors on nitrate reductase activity and concentration of nitrate and carbohydrates in leaves of eggplant (*Solanum melongena*). **Physiologia Plantarum**, Maden, v. 67, p. 73–80, 1986.

COLOZZA, M.T.; KIEHL, J.C.; WERNER, J.C.; SCHAMMASS, E.A. Respostas de *Panicum maximum* cv. Aruana a doses de nitrogênio. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 57, p. 21-32, 2000.

CORSI, M. **Effects of nitrogen rates and harvesting intervals on dry matter production, tillering and quality of the tropical grass *Panicum maximum* Jacq.** 1984. 125 p. Thesis (PhD in Agronomy) – The Ohio State University, Ames, 1984.

COSTA, J.P.R.; PAULA CAPUTTI, G. de; GALZERANO, L.; SILVA, W.L. da; RUGGIERI, A.C.; MALHEIROS, E.B. Relative chlorophyll contents in the evaluation of the nutritional status of nitrogen from xaraes palisade grass and determination of critical nitrogen sufficiency index. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 37, n. 2, p.109-114, 2015.

COSTA, K.A.P.; OLIVEIRA, I.P.; FAQUIN, V.; FIGUEIREDO, F.C.; RODRIGUES, C.R.; NASCIMENTO, P.P. Adubação nitrogenada e potássica na concentração de nutrientes do capim-xaraés. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, p. 86-92, 2008.

COSTA, K.A.P.; OLIVEIRA, I.P.; FAQUIN, V.; SEVERIANO, E.C.; GUIMARÃES, K.C.; MOREIRA, J.F.M.; BENTO, J.C. Adubação nitrogenada e potássica na produção de massa seca e composição bromatológica do capim-xaraés. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 4, p. 51-60, 2011.

De LUCENA COSTA, N.; MORAES, A. de, MOTTA, A.C.V.; MONTEIRO, A.L.G.; FACCIO CARVALHO, P.C. de; OLIVEIRA, R.A. de. Acúmulo de forragem e morfogênese de *Trachypogon plumosus* sob diferentes níveis de adubação nitrogenada = Forage accumulation and morphogenesis of *Trachypogon plumosus* under different levels of nitrogen fertilization. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 518-529, 2014.

DEUNER, S.; ALVES, J.D.; FRIES, D.D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A.A.; HENRIQUE, P.C.; GOULART, P.F.P. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 2, p. 135-140, 2008.

DOURADO, R.L.; SOUZA, A.L.; SEGATTO, C.E.; SILVA, D.R.G.; SANTOS, J.N.; BONELLI, E.A. **Características agronômicas da *Brachiaria brizantha* cv. Piatã submetida a doses de nitrogênio**. 2009. Disponível em: <<http://www.abz.org.br/publicacaoestecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/forragicultura-pastagens/21494-Charactersticasagronmicas-Brachiaria-brizantha-Piat-submetida-doses-nitrognio1.html>> Acesso: 12 abr. 2015.

DOUST, A.N. Grass architecture: genetic and environmental control of branching. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10. p. 21-25, 2007.

ELLIOTT, W.H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 201, p. 59-66, 1953.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 85, n. S2, p. S67-S74, 2001.

FAGERIA, N.K. **The use of nutrients in crop plant**. Boca Raton: CRC Press, 2009. 448 p.

FAGUNDES J.L.; FONSECA, D.M.; MISTURA, C.; MORAIS, R.V.; VITOR, C.M.T.; GOMIDE J.A.; NASCIMENTO Jr, D.; CASAGRANDE, D.R.; COSTA, L.T. Características morfogênicas e estruturais do capim-braquiária em pastagem adubada com nitrogênio avaliadas nas quatro estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 1736-1741, 2006.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Aspectos do metabolismo e utilização do nitrogênio em gramíneas tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE CALAGEM E ADUBAÇÃO DE PASTAGENS, 1., 1985, Nova Odessa. **Anais...** Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p. 93-123.

FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. cap. 5, p. 115-152.

FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E.D. Production systems: an example from Brazil. **Meat Science**, Campaign, v. 84, p. 238-243, 2010.

FITTER, A. Characteristics and functions of root systems. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant roots: the hidden half**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1 - 20.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **ANUALPEC 2013**: anuário da pecuária brasileira. 20. ed. São Paulo, 2013. 357 p.

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

FRIDIVITCH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 893, n. 1, p. 13-18, 1999.

GALANGAU, F.; DANIEL-VEDELE, F.; MOUREAUX, T. Expression of leaf nitrate reductase gene from tomato and tobacco in relation to light/dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p.383-388, 1988.

GARCEZ NETO, A.F.; NASCIMENTO JR., D.; REGAZZI, A.J.; FONSECA, D.M. da.; MOSQUIM, P.R.; GOBBI, K.F. Respostas morfogênicas e estruturais de *Panicum maximum* cv. Mombaça sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e alturas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 1890-1900, 2002.

GARCEZ, T.B. **Características produtivas, nutricionais, e metabólicas do capimmarandu submetido a doses de nitrogênio e magnésio**. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GARCEZ, T.B. **Aspectos metabólicos, nutricionais e produtivos de cultivares de Brachiaria e Panicum visando eficiência no uso do nitrogênio**. 2013. 104 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

GARCIA, C.S.; FERNANDES, A.M.; FONTES, C.A.A.; VIEIRA, R.A.M.; SANT'ANA, N.F.; PIMENTEL, V.A. Desempenho de novilhos mantidos em pastagens de capim-elefante e capim-mombaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 2, p. 403-410, 2011.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology: application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 37, p. 263-285, 2002.

GASTAL, F.; LEMAIRE, G. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 789-799, 2002.

GEORGIEVA, N.V. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems: a review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2005.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.Y.; TROJANOWSKI, J.Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases 1, 2. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 32, n. 12, p. 1264-1275, 2002.

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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 246, n. 2, p. 501-514, 1986.

HARIR, Y.; MITTLER, R. The ROS signaling network of cells: reactive oxygen species in plant signaling. **Trends in Plant Science**, Berlin, v. 9, n. 10, p. 165-174, 2009.

HAVLIN, J.L.; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L.; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers**. 7th ed. Upper Saddle River: Pearson Education, 2005. 515 p.

HELALI, S.M.; NEBLI, H.; KADDOUR, R.; MAHMOUDI, H.; LACHAËL, M.; OUEGHI, Z. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, p. 65-76, 2010.

HILL, J.O., SIMPSON, R.J., MOORE, A.D.; CHAPMAN, D.F. Morphology and response of roots of pasture species to phosphorus and nitrogen nutrition. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 286, p. 7-19, 2006.

HIREL, B.; WEATHERLEY, C.; CRETIN, C.; GADAL, P. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, Rockville, v.74, p.448-450, 1984.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso: 16 out. 2013.

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: UFV, 2010. p. 166-196.

JEWISS, O.R. Tillering in grasses: its significance and control. **Grass and Forage Science**, Hoboken, v. 27, n. 2, p. 65-82, 1972.

JIAO J.; LING S.; BENGUO, Z.; ZHENGLIANG, G.; YU, H.; XIAOPING, Z.; YUANCUN, L. Hydrogen peroxide production and mitochondrial dysfunction contribute to the fusaric acid-induced programmed cell death in tobacco cells, **Journal of Plant Physiology**, Rockville, v. 171, n. 13, p. 1197-1203, Aug. 2014.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, p. 570-576, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAVRES JÚNIOR, J.; MONTEIRO, F.A. Perfilhamento, área foliar e sistema radicular do capim-Mombaça submetido a combinações de doses de nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1068-1075, 2003.

_____. Diagnose nutricional de nitrogênio no capim-aruana em condições controladas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 829-837, 2006.

LOPES, M.N.; CÂNDIDO, M.J.D.; POMPEU, R.C.F.F.; SILVA, R.G. da; LACERDA, C.F.; BEZERRA, F.M.L. Características morfogênicas de dois tipos de perfilhos e produção de biomassa do capim-massai adubado com nitrogênio durante o estabelecimento = Morphogenic characteristics of two tillers types and biomass production of massai grass under nitrogen. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 5, p. 666-677, 2014.

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 de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, p. 1057-1063, 1998.

MACHADO, V.J.; SOUZA, C.H.E.; LANA, R.M.Q.; SILVA, A.A.; RIBEIRO, V. Produtividade da cultura do milho em função de adubação nitrogenada em cobertura. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 8, n. 5, p. 93-104, 2014.

MAGALHÃES, J.R.; MODOLO, L.V.; SOUZA, S.R.; FRESCHI, L.; FRANÇA, M.G.C.; SILVA, F.L.I.M. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. 432 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 631 p.

MANARIN, C.A.; MONTEIRO, F.A. Nitrogênio na produção e diagnose foliar do capim mombaça. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 59, p. 115-123, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MARTUSCELLO, J.A.; SILVA, L.P. da; SANTOS BATISTA, A.C. dos; SANTOS BRAZ, T.G. dos; FERREIRA, P.S. Adubação nitrogenada em capim-Massai: morfogênese e produção. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2015.

MARTUSCELLO, J.A.; FONSECA, D.M.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; SANTOS, P.M.; RIBEIRO J;UNIOR, J.I.; CUNHA, D.N.F.V.; MOREIRA, L.M. Características morfogênicas e estruturais do capim-xaraés submetido à adubação nitrogenada e desfolhação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 1475-1482, 2005.

MEGDA, M.M. **Suprimento de nitrogênio e de potássio e características morfogênicas, nutricionais e produtivas do capim-marandu**. 2009. 84 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

_____. **Formas de nitrogênio e doses de potássio no capim-marandu: atributos morfológicos, produtivos, nutricionais e bioquímicos e transformações do nitrogênio em um Neossolo**. 2013. 119 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MEGDA, M.M.; MONTEIRO, F.A. Nitrogen and potassium supply and the morphogenic and productive characteristics of marandu palisadegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 1666-1675, 2010.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 5th ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 849 p.

MILLS, H.A.; BARKER, A.V.; MAYNARD, D.N. Effects of nitrapyrin on nitrate accumulation in spinach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v. 101, p. 202–204, 1976.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 405-410, 2002.

MOKHELE, B.; ZHAN, X.; YANG, G.; ZHANG, X. Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 92, p. 399-405, 2012.

MONTEIRO, F.A. Amostragem de solos e de planta para fins de análises químicas: Métodos e interpretação de resultados. In.: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 22., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 151-179.

MORO, A.L. **Relação entre silício e deficiência sobre aspectos bioquímicos e fisiológicos no arroz**. 2012. 130 p. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

MORO, E.; CRUSCIOL, C.A.C.; NASCENTE, A.S.; CANTARELLA, H. Atividade da enzima nitrato redutase em cultivares de arroz de terras altas. **Agrarian**, Dourados, v. 7, n. 26, p. 602-607, 2014.

MOROT-GAUDRY, J.F.; TOURAINE, B. Sources of nitrogen, nitrogen cycle, root structure and nitrogen assimilation. In: MOROT-GAUDRY, J.-F. (Ed). **Nitrogen assimilation by plants**. New Hampshire: INRA, 2001. v. 1, p. 5-14.

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

NABINGER, C.; MEDEIROS, R.B. Produção de sementes de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 14., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 59-128.

OLIVEIRA, A.B.; PIRES, A.J.V.; MATOS NETO, U.; CARVALHO, G.G.P.; VELOSO, C.M.; SILVA, F.F. Morfogênese do capim-tanzânia submetido a adubações e intensidades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 1006-1013, 2007.

ONGARO, V.; LEYSER, O. Hormonal control of shoot branching. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 67-74, 2007.

PACIULLO, D.S.C.; FERNANDES, P.B.; GOMIDE, C.A.M.; CASTRO, C.R.T.; SOUZA SOBRINHO, F.; CARVALHO, C.A.B. The growth dynamics in *Brachiaria* species according to nitrogen doses and shade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 270-276, 2011.

PATÊS, N.M.S.; PIRES, A.J.V.; SILVA, C.C.F.; SANTOS, L.C.; CARVALHO, G.G.P.; FREIRE, M.A.L. Características morfogênicas e estruturais do capim-tanzânia submetido a doses de fósforo e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 1736-1741, 2007.

PEDREIRA, C.G.S.; MELLO, A.C.L.; OTANI, L. O processo de produção de forragem em pastagens. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 772-807.

PEREIRA V.V.; FONSECA, D.; MARTUSCELLO, J.; BRAZ T.G.S.; SANTOS, M.V.; CECON P.R. Características morfogênicas e estruturais de capim-mombaça em três densidades de cultivo adubado com nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 12, n. 4, p. 2681-2689, 2011.

PINHEIRO, A.A.; CECATO, U.; LINS, T.O.J.A.; BELONI, T. ; KRUTZMANN, A.; IWAMOTO, B.S.; MARI, G.C. Acúmulo e composição morfológica do pasto de capim-Tanzânia adubado com nitrogênio ou consorciado com estilosantes campo grande = Accumulation and forage morphological composition of Tanzania grass fertilized with nitrogen or intercropped with campo grand. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 3, p. 850-858, 2015.

PREMAZZI, L.M.; MONTEIRO, F.A. Produção do capim-tifton 85 submetido a doses e épocas de aplicação de nitrogênio após o corte. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 59, p. 1-16, 2002.

PREMAZZI, L.M.; MONTEIRO, F.A.; OLIVEIRA, R.F. Crescimento de folhas do capim bermuda tifton 85 submetido à adubação nitrogenada após o corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 518-526, 2011.

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. 90 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

RIBEIRO, K.G. **Rendimento forrageiro e valor nutritivo do capim-elefante “Anão”, sob cinco doses de nitrogênio, ao atingir 80 e 120 cm de altura**. 1995. 60 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

RUIZ, J.M.; RIVERO, R.; ROMERO, M.L. Comparative effect of Al, Se, and Mo toxicity on NO₃⁻ assimilation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Journal of Environmental Management**, Berkeley, v. 83, p. 207-212, 2007.

SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MURAOKA, T. Sintomas visuais de deficiências de micronutrientes e composição mineral de folhas em mudas de goiabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1655-1662, 1999.

SANTOS JUNIOR, J.D.G. **Dinâmica de crescimento e nutrição do capim Marandu submetido a doses de nitrogênio**. 2001. 79 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SANTOS JUNIOR, J.D.G.; MONTEIRO, F.A. Nutrição em nitrogênio do capim-marandu submetido a doses de nitrogênio e idades de crescimento. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 60, p. 139-146, 2003.

SANTOS, J.H.S.; DE BONA, F.D.; MONTEIRO F.A. Growth and productive responses of tropical grass *Panicum maximum* to nitrate and ammonium supply. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 42, p. 622-628, 2013.

SANTOS, P.M.; COSTA, R.Z.M. **Manejo de pastagens de capim-tanzânia**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. 26 p. (Documentos, 52).

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 54 p.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide, version 8.0. Cary, 2004. 5121 p.

SAVIDAN, Y.H.; JANK, L.; COSTA, J.C.G. **Registro de 25 acessos selecionados de *Panicum maximum***. Campo Grande: Embrapa, CNPGC, 1990. 68 p. (Documentos, 44).

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHIPPERS, P.; OLFF, H. Biomass partitioning, architecture and turnover of six herbaceous species from habitats with different nutrient supply. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 149, p. 219–231, 2000.

SCHNYDER, H.; VISSER, R. Fluxes of reserve-derived and currently assimilated carbon and nitrogen in perennial ryegrass recovering from defoliation the regrowing tiller and its component functionally distinct zones. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 1423-1435, 1999.

SILVA, C.C.S. **Morfogênese e produção de braquiárias submetidas a diferentes doses de nitrogênio**. 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2006.

SILVEIRA, C.P.; MONTEIRO, F.A. Morfogênese e produção de biomassa do capim-tanzânia adubado com nitrogênio e cálcio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 335-342, 2007.

SILVEIRA, J.A.G.; LIMA, J.P.M.S.; CAVALCANTI, F.R.; MAIA, J.M.; VIÉGAS, R.A. Salt induced oxidative response in plants: damage or protection? In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E.L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: MXM, 2005. p. 106-117.

SIMÕES, C.R.; ROSSIELLO, R.O.P.; GRACIOSAI, M.G., MACHADO, M.L.; SILVA, C.F. da. Imagens multiespectrais para avaliação de índice de área foliar e massa seca do capim 'Tifton 85', sob adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 4, p. 697-703, 2015.

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

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

SOUZA, W.M.; BREHMER, F.; NAKAO, L.S.; STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A.M. Ação da luteína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, p. 191-196, 2007.

TABATABAEI, S.J.; YUSEFI, M.; HAJILOO, J. Effects of shading and $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio on the yield, quality and N metabolism in strawberry. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 116, p. 264-272, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 102 p.

_____. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHEN, H. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1985. 188 p. (Boletim Técnico, 5).

VIANA, M.C.M.; SILVA, I.P.D.; FREIRE, F.M.; FERREIRA, M.M.; COSTA, É.L.D.; MASCARENHAS, M.H.T.; TEIXEIRA, M.F.F. Production and nutrition of irrigated Tanzania guinea grass in response to nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 43, n. 5, p. 238-243, 2014.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 3, p. 313-324, 1993.

VITOR, C.M.T.; COSTA, P.M.; VILLELA, S.D.J.; PAULA LEONEL, F. de; FERNANDES, C.F.; ALMEIDA, G.O. Características estruturais de uma pastagem de *Brachiaria decumbens* stapf cv. basilisk sob doses de nitrogênio. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 71, n. 2, p. 176-182, 2014.

VIUDES, E.B.; SANTOS, A.C.P. Caracterização fisiológica e bioquímica de artemisia (*Artemisia annua* L.) submetida a estresse salino. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 10, n.2, p. 84-91, 2014.

VOLPE, E.; MARCHETTI, M.E.; MACEDO, M.C.M.; LEMPP, B. Acúmulo de forragem e características do solo e da planta no estabelecimento de capim-massai com diferentes níveis de saturação por bases, fósforo e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 228-237, 2008.

WANG, J.; ZHANG, H.; ALLEN, R.D. Over expression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 40, p. 725-732, 1999.

WERNER, J.C. **Adubação de pastagens**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1986. 49 p. (Boletim Técnico, 18).

WERNER, J.C.; PAULINO, V.T.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, N.O.; QUAGGIO, J.A. Forrageiras. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Fundação IAC, 1996. p. 263-274. (IAC. Boletim Técnico, 100).

WHITEHEAD, D.C. **Nutrient elements in grassland: soil-plant-animal relationship**. New York: CABI, 2000. 369 p.

YANEVA, I.A.; BAYDANOVA, V.D.; VUNKOVA-RADEVA, R.V. Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.157, p.495-501, 2000.

ZENG, H.W.; CAI, Y.J.; LIAO, X.R.; QIAN, S.L.; ZHANG, F.; ZHANG, D.B. Optimization of catalase production and purification and characterization of a novel cold-adapted Cat-2 from mesophilic bacterium *Serratia marcescens* SYBC-01. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 60, n. 4, p. 701-708, 2010.

ZHAO, Y. Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, p. 2936-2943, 2011.