

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**TESE**

**Metabolismo Nitrogenado e Biomassa do Capim-Tifton 85**  
**Submetido a Nutrição Nítrica ou Amoniacal**

**Élio Barbieri Junior**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**METABOLISMO NITROGENADO E BIOMASSA DO CAPIM-  
TIFTON 85 SUBMETIDO A NUTRIÇÃO NÍTRICA OU  
AMONÍACAL**

**ÉLIO BARBIERI JUNIOR**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Roberto Oscar Pereyra Rossiello**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ  
Outubro de 2012

572.545

B236m

T

Barbieri Junior, Élio, 1982-

Metabolismo nitrogenado e biomassa do Capim-Tifton 85 submetido a nutrição nítrica ou amoniacal / Élio Barbieri Junior - 2012.

84 f. : il.

Orientador: Roberto Oscar Pereyra Rossiello.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 71-84.

1. Nitrogênio - Fixação - Teses. 2. Plantas - Efeito do nitrogênio - Teses. 3. Plantas forrageiras - Nutrição - Teses. 4. Aminoácidos - Metabolismo - Teses. I. Rossiello, Roberto Oscar Pereyra, 1948-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

Bibliotecário: \_\_\_\_\_


Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA


ÉLIO BARBIERI JUNIOR

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

TESE APROVADA EM 15/10/2012

  
Roberto Oscar Pereira Rossiello. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

  
Marcel Giovanni Costa França. Dr. UFMG

  
Antônio Carlos Coser. Dr. UFES

  
Robert de Oliveira Macedo. Dr. UFRRJ

  
Carlos Alberto Bucher. Dr. UFRRJ

  
Luiz Fernando Duarte de Moraes. Dr. EMBRAPA

## **DEDICATÓRIA**

A um ROBERTO, que marcou minha vida acadêmica e profissional e a uma  
ROBERTA, minha alma gêmea e fonte de inspiração.

**Dedico esta obra.**

## AGRADECIMENTO

A Deus, grande criador do universo, pela fé, esperança, por sempre iluminar meus caminhos e colocar pessoas maravilhosas em minha vida, pessoas que muito me ensinaram.

Ao amigo e mentor Prof. Dr. Roberto Oscar Pereyra Rossiello, que tanto admiro, pela orientação, confiança, apoio, estímulo, carinho e amizade que fomos adquirindo ao longo do tempo. Muito obrigado mestre !!! A dona Iracema Rossiello pelo carinho, compreensão e amizade.

A minha esposa e companheira de todas as horas Roberta Cristiane Ribeiro que foi fundamental para a conquista deste grande sonho. Amo muito você.

A meus pais Élio Barbieri e Aladaide Terezinha Barbieri, pelo amor, incentivo e compreensão pelos anos que estive ausente.

Ao casal Osvaldo Tolentino Ribeiro e Neide Teruco Ribeiro pelo incentivo, companheirismo, apoio e pelas orações abençoadas.

Aos colegas de Pós Graduação Osmário Araújo, Natália Zatorre e Rafael Antônio Prezotto que acompanharam essa jornada frenética.

Aos estagiários amigos Wellington Urselino, Camila Figueiredo, Douglas de Maoraes, Ingrid B. Flexa, Thais, Denilson, Klayton, Leandro, Renan, Letícia dentre outros pelo auxílio nos trabalhos experimentais em laboratório.

Aos professores e pesquisadores, Manilo Silvetre Fernandes, Everaldo Zonta, Carlos Alberto Bucher, Sônia Regina de Souza, e Carlos Alberto Varella que contribuíram decisivamente para a realização e melhoria deste trabalho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

À equipe diretiva do IFMT *campus* Confresa (Aluízio A. da Costa, Marco Antônio V. Moraes, Mara M. Dutra e principalmente Willan Silva de Paula) pelo apoio, em diferentes épocas, para conclusão deste trabalho.

Ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela compreensão e confiança que nos foi dada.

Ao CNPq, FAPERJ e FAPEMAT pelos recursos financeiros e bolsa de estudo fornecida para realização do projeto.

A todos que por circunstância do momento não foram citados, e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADO!!!

“Nascer, morrer, renascer ainda e  
Progridir sem cessar,  
Tal é a lei”

*Allan Kardec*

## BIOGRAFIA

Élio Barbieri Junior, filho de Élio Barbieri e de Aladaides Terezinha Barbieri, nasceu no dia 25 de Fevereiro de 1982, no município de Sinop, norte do estado de Mato Grosso.

Cursou o primeiro grau em escolas estaduais de Mato Grosso e concluiu o segundo grau na Escola Agrotécnica Federal de Cuiabá.

Obteve formação de Técnico Agrícola com habilitação em Zootecnia pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Cuiabá (CEFET-Cuiabá).

Em 2002 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), onde cursou um semestre. Ainda em 2002 reiniciou seus estudos, agora na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), graduando-se como Médico Veterinário por esta instituição em Agosto de 2007.

Durante a Graduação foi bolsista na categoria de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante o período de 2004-2007. Ainda durante a graduação foi monitor da disciplina Plantas Forrageiras pelo período de um ano.

Em agosto de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ em nível de Mestrado, com bolsa da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Concluiu o curso de Mestrado em Fevereiro de 2009. Em Março do mesmo ano iniciou seu doutoramento em Zootecnia na mesma instituição.

Em janeiro de 2010 foi empossado professor efetivo do Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT *Campus Confresa*) na área de zootecnia.

Concluiu o curso de Doutorado em Zootecnia no dia 15 de outubro de 2012.



## RESUMO

BARBIERI JUNIOR, Élio. **Metabolismo Nitrogenado e Biomassa do Capim-Tifton 85 Submetido a Nutrição Nítrica ou Amoniacal**. 2012. 84p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

As respostas das plantas forrageiras à nutrição nitrogenada depende não somente da quantidade do nutriente disponível mas também da sua forma química, como íons  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$ . Ambas as formas podem ser absorvidas e metabolizadas, com consequências diferenciadas para a produtividade vegetal. Algumas espécies tem preferência ecológica por uma ou outra forma, enquanto a maioria produz mais usando as formas em combinação. Para verificar o comportamento metabólico e produtivo do capim Tifton 85 em relação a formas e doses de N mineral foram conduzidos dois experimentos, nas instalações do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica-RJ. O experimento I foi conduzido em câmara de crescimento tipo *fitotron* sob condições controladas, utilizando-se cultivo hidropônico e teve duração de 35 dias, contados a partir de um corte de uniformização (DAC). Os tratamentos consistiram de duas formas de N:  $\text{NH}_4^+$  (sulfato de amônio) e  $\text{NO}_3^-$  (nitrato de Ca, Mg e K) combinadas com quatro doses de aplicação: 0,5; 2; 5 e 10 mM, respectivamente, e quatro datas de amostragem, aos 14, 21, 28 e 35 DAC. O experimento II foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se como substrato de crescimento, terra proveniente do horizonte superficial de um Planossolo Háptico, de ocorrência na área da UFRRJ e sob cultivo de Tifton 85. Utilizou-se uma única fonte de N, representativa das duas formas (nitrato de amônio), aplicado em quatro doses (de 0, 80, 160 e 240mg N kg solo<sup>-1</sup>) e avaliado em quatro épocas (aos 14, 21, 28 e 35 DAC). Em ambos os experimentos os tratamentos foram repetidos quatro vezes. Foram feitas as seguintes determinações: massa fresca e seca de raízes, parte aérea e total, teores de N-total, N-solúvel (N- $\text{NO}_3^-$ , N- $\text{NH}_4^+$  e N-amino livre); atividade da nitrato redutase e carboidratos solúveis em etanol 80%, todos determinados em lâminas foliares, bainhas, colmos e raízes; assim como teores de clorofila foliar (extraída com N,N dimetilformamida) e ainda determinada com clorofilômetro. Em relação a formas de N inorgânico isoladas, o capim Tifton 85 respondeu à nutrição amoniacal, em relação à nítrica, com maior produção de massa fresca e massa seca total, maior fração de alocação da biomassa total às raízes, maior teor de clorofila total e maiores teores de açúcares solúveis e aminoácidos em folhas e raízes. Além disso, apresentou baixos teores de N- $\text{NH}_4^+$  em todos compartimentos das plantas, mesmo em altas doses de N. Sob o ponto de vista nutricional, as concentrações encontradas para N- $\text{NO}_3^-$ , mesmo nas doses de N mais elevadas, não oferecem risco de intoxicação de animais ruminantes. Quanto a utilização de forma mista ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ), o comportamento metabólico das plantas sob este tratamento maximizou a produção de biomassa e reproduziu traços similares aos verificados sob nutrição puramente amoniacal, incluindo maior produção de clorofila, e alocação preferencial de açúcares solúveis e aminoácidos em raízes e colmos. A nutrição mista não aumentou a eficiência assimilatória em relação à utilização exclusiva de nutrição amoniacal ou nítrica. Foi concluído que uma nutrição 100% amoniacal, ou 50%  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ , foram superiores, em termos de eficiência assimilatória de N, do que uma nutrição 100% nítrica, fenômeno este não documentado.

**Palavras-Chave:** *Cynodon* spp. Aminoácidos livres. Atividade da nitrato redutase. Teor Açúcares solúveis.

## ABSTRACT

BARBIERI JUNIOR, Élio. **Nitrogen Metabolism and Biomass of Tifton 85 Bermudagrass under Nitrate or Ammonium Nutrition.** 2012. 84p. Thesis (Ph.D. in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The responses of forage plants to nitrogen nutrition depends not only on the amount of nutrient available but also its chemical form, as  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$ . Both forms may be absorbed and metabolized with different consequences for the plant productivity. Some species have ecological preference for one or another form, whereas for higher production most use in combination forms. To verify the metabolic behavior and productive of the Tifton 85 in relation to forms and levels of mineral N, two experiments were carried at the Institute of Agronomy, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), RJ-Seropédica. The first experiment was conducted in a growth chamber type phytotron under controlled conditions, using hydroponics and lasted 35 days, counted from a uniformity cut (DAC). Treatments consisted of two forms of N:  $\text{NH}_4^+$  (ammonium sulfate) and  $\text{NO}_3^-$  (nitrate Ca, Mg and K) combined with four levels of application: 0.5, 2, 5 and 10 mM, respectively, and four dates sampling at 14, 21, 28 and DAC 35. The second experiment was carried out in a greenhouse, using as growth substrate, soil from the surface horizon of a Haplic Planossolo, occurring in the area under cultivation UFRRJ and Tifton 85. We used a single source of N, representative of the two forms (ammonium nitrate) applied at four rates (0, 80, 160 and 240 mg N kg<sup>-1</sup> soil) and assessed four times (at 14, 21, 28 and 35 DAC). In both experiments, treatments were repeated four times. We made to the following determinations: fresh and dry mass of roots, shoots and total concentrations of total-N, N-soluble (N- $\text{NO}_3^-$ , N- $\text{NH}_4^+$  and N-amino free); activity of nitrate reductase and soluble carbohydrates in 80% ethanol, all determined in leaf blades, sheaths, stems and roots, and leaf chlorophyll content (extracted with N, N-dimethylformamide) and still determined chlorophyll. Regarding the isolated forms of inorganic N, Tifton 85 grass responded to ammonium nutrition, nutrition in relation to nitrate, with increased production of fresh and dry weight total, largest fraction of the total biomass allocation to roots, higher total chlorophyll content and higher levels of soluble sugars and amino acids in leaves and roots. Additionally, showed low concentrations of N- $\text{NH}_4^+$  in all compartments of plants, even at high doses of N. From the nutritional point of view, the concentrations found for N- $\text{NO}_3^-$ , even in higher doses of N offer no risk of intoxication of ruminant animals. As the use of mixed form ( $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ), the metabolic behavior of plants under treatment maximized the production of biomass and reproduced traits similar to those seen in purely ammoniacal nutrition, including increased production of chlorophyll, and preferential allocation of soluble sugars and amino acids in roots and culms. Nutrition mixed assimilation not increased efficiency compared to the use of nitrate or ammonium nutrition. It was concluded that a nutrition 100% ammonia or 50%  $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ , resulted higher in efficiency assimilation of N, nutrition than 100% nitric, this phenomenon is not documented.

**Key words:** *Cynodon* spp. Free amino acids. Nitrate-reductase activity. Soluble sugars content.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Formulação da solução de micronutrientes utilizada no experimento para solução nutritiva.....	13
<b>Tabela 2.</b>	Formulação da solução de nutritiva (macronutrientes) utilizada, na avaliação da forma N-nitrato como fonte de N.....	13
<b>Tabela 3.</b>	Formulação da solução de nutritiva (macronutrientes) utilizada, na avaliação da forma N-amônio como fonte de N.....	14
<b>Tabela 4.</b>	Análise química da camada arável (0-0,2 m) do Planossolo Háplico utilizado no experimento II.....	14
<b>Tabela 5.</b>	Coefficientes de correlação simples entre os teores de N total em folhas e colmos do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, com duas formas de N mineral, e os valores da massa seca total (MST, raiz + p. aérea) ou da massa seca da parte aérea (MSPA).....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Diagrama do ciclo do N em uma pastagem. Os compartimentos são mostrados em seus tamanhos relativos: NO (N orgânico do solo); NBM (N na biomassa microbiana); NBF (N da fauna do solo); NBH (N na biomassa de herbívoros); NBP (N na biomassa da pastagem - raízes e parte aérea, 1:1) e NI (N inorgânico na solução do solo - $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^-$ ). Fonte: Modificado de RUSSELLE (1992).....	04
<b>Figura 2.</b>	Esquema geral da Absorção de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) através da membrana plasmática vegetal. (1) Bomba de prótons (ATP-ase); (2) Transportador de $\text{NO}_3^-$ ; (3) Transportador de $\text{NH}_4^+$ . Fonte: Fernandes (2006).....	05
<b>Figura 3.</b>	Esquema da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas ( $\text{NO}_3^-$ : nitrato; $\text{NO}_2^-$ : nitrito; $\text{NH}_4^+$ : amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN: redutase do nitrato; RiN: redutase do nitrito; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase). Fonte: adaptado de Bredemeier & Mundstock (2000).....	06
<b>Figura 4.</b>	Disposição das mudas dentro da câmara de crescimento A. Vista geral dos vasos dentro do <i>fitotron</i> . B. Outro ângulo mostrando as plantas dispostas nas bancadas, a 1,0 m de altura.....	12
<b>Figura 5.</b>	A) Corte de uniformização do capim, na casa de vegetação; B) Aspecto dos vasos após o corte de uniformização.....	15
<b>Figura 6.</b>	Vista parcial do experimento II, mostrando a disposição dos vasos na casa de vegetação.....	15
<b>Figura 7.</b>	A. Detalhe do laboratório onde foram realizadas as determinações analíticas. B. Instrumentos utilizados na retirada dos discos foliares.....	17
<b>Figura 8.</b>	Variação da massa fresca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	20
<b>Figura 9.</b>	Variação temporal da massa fresca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=8$ repetições por tratamento.....	20
<b>Figura 10.</b>	Variação da massa fresca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	21
<b>Figura 11.</b>	Massa fresca radicular média, produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, com duas formas e quatro concentrações de N mineral. Barra vertical indica o erro padrão de $n=16$ observações por forma de N. Médias: $\text{NO}_3^- = 6,03 \pm 0,255$ g/vaso; $\text{NH}_4^+ = 9,89 \pm 0,241$ g/vaso.....	22
<b>Figura 12.</b>	Massa fresca radicular produzida pelo capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas e quatro concentrações de N mineral. Barra vertical indica erro padrão de $n=16$ repetições por tratamento.....	23
<b>Figura 13.</b>	Variação temporal da massa fresca radicular produzida pelo capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas e quatro concentrações de N mineral. As taxas de crescimento são: $\text{NO}_3^-$ : 59,4 e $\text{NH}_4^+$ : 81,3 $\text{mg g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ , respectivamente. Barra vertical indica erro padrão	

	de $n= 8$ repetições por tratamento.....	23
<b>Figura 14.</b>	Diferenças visuais observadas no desenvolvimento radicular do capim-Tifton 85 em resposta à nutrição amoniacal, aos 35 dias do período de rebrota. A: 0,5 mM; B: 10 mM.....	24
<b>Figura 15.</b>	Relação parte aérea/raiz, base massa fresca, do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	25
<b>Figura 16.</b>	Variação da matéria seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	27
<b>Figura 17.</b>	Variação temporal da massa seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão da média de $n= 4$ repetições por tratamento.....	27
<b>Figura 18.</b>	Variação temporal da massa seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral. Barra vertical indica erro padrão da média de $n= 4$ repetições por tratamento.....	28
<b>Figura 19.</b>	Variação da massa seca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=16$ repetições por tratamento.....	29
<b>Figura 20.</b>	Variação da massa seca de raízes do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	30
<b>Figura 21.</b>	Variação da relação peso fresco/peso seco da parte aérea, na média das formas de N, em função das doses de N aplicadas. Barra vertical indica erro padrão de $n =4$ valores por tratamento.....	30
<b>Figura 22.</b>	Variação da relação folha/colmo (F:C) em plantas de capim Tifton 85 cultivadas sob duas formas de N. Barra vertical indica erro padrão de $n =64$ valores.....	31
<b>Figura 23.</b>	Variação da relação folha/colmo em plantas de capim Tifton 85 cultivadas em função da adubação nitrogenada, independentemente de forma de N aplicada e dias de crescimento. Barra vertical indica erro padrão de $n=32$ valores por tratamento.....	32
<b>Figura 24.</b>	Variação da relação folha/colmo em plantas de capim Tifton 85 cultivadas em duas formas de N e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de $n=32$ valores por tratamento.....	32
<b>Figura 25.</b>	Teores de clorofila total, extraídos com MDF, em folhas do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. As equações correspondentes são: $Y(\text{NO}_3^-) = 512 - 320,4. \exp(- 0,1555.x)$ ; $Y(\text{NH}_4^+) = 597,1 - 367,1. \exp(- 0, 4857.x)$ . Barra vertical indica erro padrão de $n= 4$ repetições por tratamento.....	34
<b>Figura 26.</b>	Variação temporal dos teores de clorofila extraída de discos foliares, obtidos de folhas do Tifton 85 cultivado com N na forma nítrica e amoniacal, em quatro épocas de amostragem. A) Clorofila total; B) Clorofila <i>a</i> ; C) Clorofila <i>b</i> . As curvas conectando os pontos foram geradas	

	iterativamente pelo procedimento de análise gráfico “ <i>Cubic spline</i> ” (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2003). Barra vertical indica o erro padrão da média.....	35
<b>Figura 27.</b>	Variação temporal da relação entre teor de clorofila <i>a</i> :clorofila <i>b</i> , em folhas do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em função de forma de N. Barra vertical indica o erro padrão da média.....	36
<b>Figura 28.</b>	Valores de clorofila total ( <i>a + b</i> ) obtidos por leitura de clorofilômetro, e expressos em unidades relativas (Índice de Clorofila Falker Total, ICF-T), em lâminas foliares do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica o erro padrão da média.....	37
<b>Figura 29.</b>	Teores de nitrogênio total no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. A) Bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	39
<b>Figura 30.</b>	Teores de nitrogênio total no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. A) Bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	41
<b>Figura 31.</b>	Teores de N-amônio no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	42
<b>Figura 32.</b>	Teores de N-nitrato no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a quatro doses de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mineral A) Bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	45
<b>Figura 33.</b>	Teores de N- $\alpha$ amino do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	46
<b>Figura 34.</b>	Atividade média da nitrato redutase (ANR) no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva com quatro doses de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão da média.....	48
<b>Figura 35.</b>	Variação temporal da atividade da enzima redutase do nitrato em partes do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva em função de doses de N aplicadas. A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	49
<b>Figura 36.</b>	Variação nos teores de açúcares solúveis no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	50
<b>Figura 37.</b>	Produção de massa fresca total do capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em resposta à aplicação de quatro doses de N na forma de nitrato de amônio. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por dose experimental.....	51
<b>Figura 38.</b>	Variação temporal da massa fresca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em casa de vegetação, em resposta a quatro doses de nitrato de amônio. Barra vertical indica erro padrão de <i>n</i> =4 repetições por tratamento.....	52

<b>Figura 39.</b>	Produção de massa fresca total do capim Tifton 85, aos 28 e 35 dias de rebrota, em função de doses de N aplicadas. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por ponto.....	52
<b>Figura 40.</b>	Massa fresca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85, em resposta a quatro doses de N mineral, e quatro idades (DAC) das plantas. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	53
<b>Figura 41.</b>	Variação temporal da massa seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em casa de vegetação, em resposta a quatro doses de nitrato de amônio. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	54
<b>Figura 42.</b>	Produção de massa seca total do capim Tifton 85, aos 28 e 35 dias de rebrota, em função de doses de N. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por ponto.....	54
<b>Figura 43.</b>	Massa seca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85, em resposta a quatro doses de N mineral, e quatro épocas de coleta. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ repetições por tratamento.....	55
<b>Figura 44.</b>	Variação da relação folha/colmo em plantas de capim Tifton 85 cultivadas em solo, sob condições de casa de vegetação, em função da dose e dias após corte de uniformização (DAC). Barra vertical indica erro padrão de $n=12$ valores por tratamento.....	56
<b>Figura 45.</b>	Variação temporal da relação folha colmo no capim Tifton 85 cultivado em vasos com solo, em casa de vegetação, com quatro doses de nitrato de amônio. Barra vertical indica o erro padrão da média.....	57
<b>Figura 46.</b>	Variação temporal (DAC) nos teores de N total no capim no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ observações. n.d.= Não determinado.....	58
<b>Figura 47.</b>	Variação temporal nos teores de N-amônio no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ observações. n.d.= não determinado.....	59
<b>Figura 48.</b>	Variação temporal nos teores de N-nitrato no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ observações. n.d.= não determinado.....	61
<b>Figura 49.</b>	Variação temporal nos teores de N-amino no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ observações. n.d.= não determinado.....	63
<b>Figura 50.</b>	Variação temporal da atividade da enzima nitrato redutase no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ observações. n.d.= não determinado.....	64
<b>Figura 51.</b>	Variação temporal dos teores de açúcares solúveis no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de $n=4$ observações. n.d.= não determinado.....	65
<b>Figura 52.</b>	Variação temporal dos teores de clorofila extraída de discos foliares, obtidos de folhas do Tifton 85, em função de quatro níveis de adubação nitrogenada. A) Clorofila total; B) Clorofila <i>a</i> ; C) Clorofila <i>b</i> . As curvas	

	conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	67
<b>Figura 53.</b>	Varição temporal de leituras do clorofilômetro (ICF) para o teor de clorofila total (A) em folhas do Tifton 85, após corte de uniformização, para quatro níveis de adubação nitrogenada. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. Barra vertical indica o desvio padrão da média.....	68



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 Formas de N Inorgânico no Solo.....	3
2.2 Aquisição de N pelas Plantas.....	5
2.3 Assimilação do Nitrogênio.....	6
2.4 Influência do Nitrogênio no Metabolismo e Desenvolvimento Vegetal.....	7
2.5 Acúmulo Foliar e Intoxicação de Bovinos por $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ .....	8
2.6 Toxidez pelo Amônio em Plantas.....	9
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1 Obtenção de Propágulos.....	11
3.2 Experimento I – Câmara de Crescimento ( <i>Fitotron</i> ).....	11
3.2.1 Tratamentos.....	12
3.2.2 Ajuste das condições ambientais de cultivo.....	12
3.2.3 Composição da solução nutritiva.....	13
3.3. Experimento II - Casa de Vegetação.....	14
3.4 Determinações Experimentais.....	15
3.4.1 Atividade da nitrato redutase.....	16
3.4.2 N- $\text{NO}_3^-$ , N- $\text{NH}_4^+$ , N-amino livre e açúcares solúveis.....	16
3.4.3 Índice de clorofila (ICF).....	16
3.4.4 Quantificação de clorofilas por extração direta.....	16
3.4.5 N-total.....	17
3.4.6 Produção de massa seca fresca e seca.....	17
3.5. Análises Estatísticas.....	18
<b>4. RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	19
4.1 Experimentação em Ambiente Controlado (Experimento I).....	19
4.1.1 Massa fresca.....	19
4.1.2 Massa seca.....	26
4.1.3 Relação massa fresca/massa seca.....	30
4.1.4 Relação folha colmo (F:C).....	31
4.1.5 Absorção e metabolismo do nitrogênio no capim Tifton 85.....	33
4.1.5.1. Teores de clorofila extraída.....	33
4.1.5.2 Teores de clorofila (via clorofilômetro).....	36
4.1.5.3 Nitrogênio total.....	38
4.1.5.4 N-solúvel: teores de N-amônio, N-nitrato, N-amino livre e atividade da nitrato redutase.....	41
4.1.5.5. Açúcares solúveis.....	49
4.2 Experimentação em Casa de Vegetação (Experimento II).....	51
4.2.1 Efeitos das variáveis experimentais sobre o crescimento: Massa Fresca.....	51
4.2.2. Massa seca.....	53
4.2.3. Relação folha/colmo.....	55
4.2.4 Variáveis relacionadas ao metabolismo da planta: nitrogênio total, N-amônio, N-nitrato, N-amino e atividade da nitrato redutase (ANR).....	57
4.2.5 Açúcares solúveis.....	65
4.2.7 Teores de clorofila extraída.....	66
4.2.8 Determinação com clorofilômetro (ICF T).....	68
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	70
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71



# 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o macronutriente de maior demanda metabólica pelas gramíneas forrageiras, uma vez que é um componente estrutural de proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, coenzimas e numerosas outras moléculas do metabolismo secundário, representando cerca de 2% da massa seca total da planta (MILLER & CRAMER, 2004).

De forma geral, o cátion amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), oriundo da desaminação dos compostos orgânicos em decomposição (amonificação), ou da adição de fertilizantes amoniacais, e o ânion nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), resultante da oxidação biológica (nitrificação) do amônio, são as formas comuns de N-mineral disponíveis aos sistemas radiculares das plantas. Essa constatação, feita há muito tempo, propiciou uma extensiva série de estudos, conduzida por muitos grupos de pesquisa do mundo, com objetivo de elucidar os mecanismos de absorção dessas formas minerais, assim como as consequências metabólicas e fisiológicas relacionadas com a sua assimilação. Por força da importância alimentar e econômica das espécies envolvidas, o foco dessas pesquisas recaiu inicialmente sobre as poaceae produtoras de grão, como milho, arroz, trigo e cevada (RAO & RAINS, 1976; FERNANDES & ROSSIELLO, 1979; INSANDE & TOURAINÉ, 1994; BRITTO & KRONZUCKER, 2002). Aspectos ecofisiológicos e agronômicos foram incorporados a esses estudos básicos (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995; LEMAIRE et al., 2008). Em anos mais recentes, estudos sobre transportadores e sua expressão gênica tem se tornado focos importantes da pesquisa nesta área (MOKHELE et al., 2012). Em relação às plantas forrageiras, estudos similares foram conduzidos, embora em menor quantidade, tanto em espécies de clima temperado como tropical.

O N é considerado o nutriente mais crítico para a produção das pastagens, por ser muito instável no ecossistema solo-planta-animal. Com efeito, num sistema pastoril típico, o N circula através de diversas vias, tanto biológicas quanto químicas, as quais envolvem mudanças no estado de oxidação e de fase (sólido-líquido-gás) do elemento, entre os vários compartimentos, ou “pools”, pelos quais circula (ROSSIELLO et al., 2007).

Os teores de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no solo, dependem da fonte e quantidade do N adicionado, assim como do balanço entre os processos de amonificação, nitrificação, imobilização e desnitrificação, modulados por flutuações ambientais e pelo sistema de utilização da pastagem. Desses processos, a nitrificação exerce um papel central no funcionamento de muitos ecossistemas, já que além de estar envolvido diretamente na nutrição vegetal, regula a magnitude das perdas de N através da lixiviação e/ou denitrificação do ânion nitrato (ROSSIELLO et al., 2007). O N é perdido principalmente pela lixiviação de nitrato, a volatilização de amônia e a emissão de gases como  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ , fortes contribuintes ao aquecimento atmosférico (ISHIKAWA et al., 2003). Nessa última direção, Jackson et al. (2008) afirmaram que pode ser esperado que tanto a disponibilidade de N quanto a proporção de  $\text{NH}_4^+$  vs.  $\text{NO}_3^-$  no solo venham a influenciar as respostas vegetais à elevação do teor de  $\text{CO}_2$  na atmosfera. Isto tem conduzido à percepção de que pesquisas que contribuam para uma maior compreensão da química de N no solo, e da bioquímica da absorção e assimilação das formas de N disponíveis às plantas, podem ajudar no desenho de melhores práticas de manejo para ecossistemas naturais ou cultivados.

Tem sido estimado que, normalmente, menos de 50% do N aplicado sob a forma de fertilizante é utilizado pelas culturas. Como os adubos nitrogenados são insumos de grande peso nos custos da produção agropecuária, o tema da eficiência da sua utilização também está ligado à eficiência com a qual as plantas absorvem as formas de N mineral

disponíveis na solução do solo (GLASS, 2003). A pesquisa conduzida até o presente, sobre os diversos aspectos da absorção e utilização de N pelas plantas, tem mostrado que além da quantidade suprida, a forma de N disponível às plantas exerce efeitos significativos sobre a fotossíntese e o crescimento vegetal (ZHOU et al., 2011). Também ficou evidente que as preferências entre as formas nítrica ou amoniacal variam entre as espécies vegetais. Assim, embora as plantas às vezes consigam metabolizar grandes quantidades de  $\text{NH}_4^+$ , sem mostrar sintomas de toxidez, a nutrição amoniacal via sistema radicular pode afetar negativamente o metabolismo e por consequência, o crescimento vegetal (FERNANDES, 2006). De fato, muitas espécies mostram maior crescimento quando cultivadas com ambas as formas conjuntamente, em comparação com a nutrição nítrica ou amoniacal, isoladamente (GLASS et al., 2002).

Segue-se que o conhecimento das respostas metabólicas às diferentes doses e formas de N são indispensáveis para o manejo adequado e uso mais eficiente da adubação nitrogenada, minimizando ao mesmo tempo perdas de nutrientes para o sistema, assim como problemas potenciais de toxidade nas plantas e intoxicação em animais. Assim, há uma vasta agenda de temas, tanto do ponto de vista ecológico quanto produtivo, ligada à absorção, assimilação e utilização das formas de N-mineral por parte das espécies forrageiras.

Para a realização do presente estudo foi escolhido o capim Tifton 85 (*Cynodon* spp.), uma espécie forrageira considerada exigente em fertilidade e responsiva à adubação nitrogenada, da qual não se conhecem os limites ecofisiológicos de tolerância/sensibilidade à nutrição nítrica ou amoniacal, fornecida seja de forma isolada ou combinada.

Duas hipóteses de trabalho nortearam os experimentos. Como ponto de partida, foi suposto que a nutrição nítrica, de forma exclusiva, deveria conduzir a uma maior eficiência de assimilação de N por parte do capim, em relação à nutrição amoniacal exclusiva. Para testar essa hipótese, foi realizado um experimento, em solução nutritiva, sob condições ambientais pré-fixadas. Numa segunda instância, foi pesquisado o comportamento assimilatório do capim Tifton 85 frente a uma nutrição mista (50%  $\text{NH}_4^+$ : 50%  $\text{NO}_3^-$ ), em experimento conduzido com solo em condições de casa de vegetação. A ideia a ser testada foi a de que uma nutrição mista deveria aumentar a eficiência assimilatória do capim em relação à obtida com utilização de nutrição amoniacal ou nítrica exclusiva. Para verificar a validade dessas hipóteses, ambos os experimentos tiveram os seguintes objetivos: 1) quantificar os efeitos das fontes de N sobre a produção de massa fresca e seca de raízes, colmos, bainhas e lâminas foliares do capim Tifton 85 aos 14, 21, 28 e 35 dias de um ciclo de rebrota; 2) determinar as concentrações e as flutuações temporais dos teores de açúcares solúveis, N-amônio, N-nitrato, N-amino e N-total em raízes, colmos, bainhas e lâminas foliares do capim Tifton 85; 3) avaliar os níveis de atividade da enzima nitrato redutase nas diferentes partes da planta; e 4) determinar, nas primeiras folhas expandidas, o teor de clorofila extraída diretamente, assim como comparar esse método com um outro consistente no uso de um clorofilômetro portátil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Existem diversos fatores que influenciam na produtividade de uma pastagem. Um dos mais significativos é o baixo teor de nitrogênio (N) presente na maioria dos solos brasileiros, o que resulta na baixa produtividade observada em grande parte dos sistemas de produção em pastagem (SOARES et al., 1998; COSTA et al., 2008). Além da disponibilidade deste nutriente no solo, a eficiência na absorção e uso do N (nas suas formas iônicas) pelas plantas torna-se relevante no contexto de sustentabilidade dos sistemas produtivos, principalmente sistemas de pastagens com elevado uso de fertilizantes (CORREA et al., 2007).

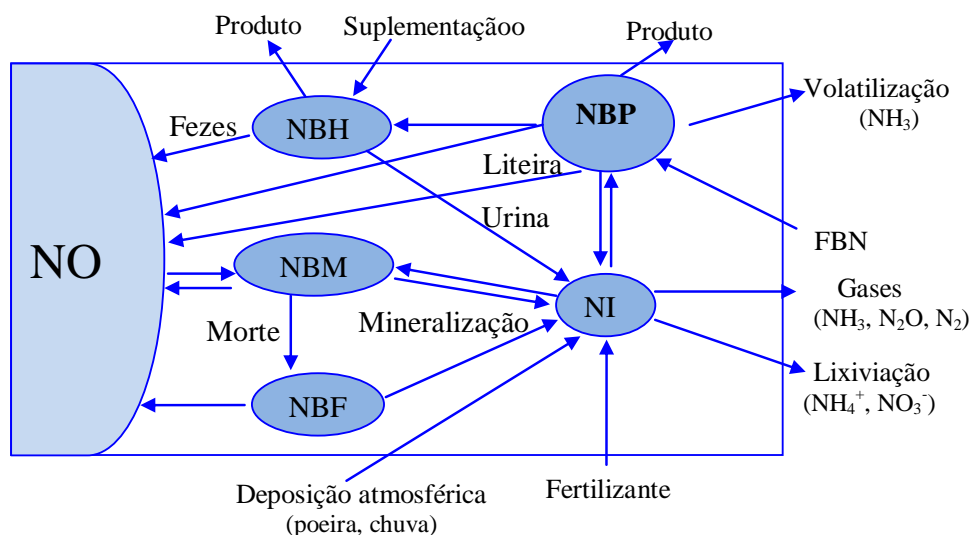
Desta forma, torna-se importante conhecer as formas iônicas do N mineral preferencialmente absorvidas pela espécie forrageira, como forma de subsidiar a definição de melhores práticas de manejo da adubação nitrogenada para *Cynodon spp* (GLASS et al., 2002; MILLER & CRAMER, 2004; CHIEN et al., 2009).

### 2.1 Formas de N Inorgânico no Solo.

As formas mais abundantes de N inorgânico na solução do solo são o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), intensamente estudado ao longo dos anos (FERNANDES & ROSSIELLO, 1986; RUSSELLE, 1992; JARVIS et al., 1995; CANTARELLA, 2007; JACKSON et al., 2008).

No solo, o N tem origem dos resíduos vegetais, animais e pela fixação do N atmosférico ( $\text{N}_2$ ), já que esse nutriente não faz parte da rocha matriz. Apesar de abundante na atmosfera, o  $\text{N}_2$  não está disponível a uma grande parte dos organismos vegetais, sendo necessário o emprego de processos microbiológicos, elétricos e de combustão para sua natural fixação e incorporação nos solos (RUSSELLE, 1992).

Em um sistema pastoril é possível que existam pelo menos quatro fontes de ingresso de N à pastagem (Figura 1). A partir da atmosfera, o N pode ser adicionado por duas vias: pela deposição (seca ou úmida), de formas inorgânicas ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ), em que compostos orgânicos complexos, contidos em poeiras ou dissolvidos na água das chuvas e pela fixação biológica do  $\text{N}_2$  atmosférico (RUSSELLE, 1992). Outra via é a constituída pela incorporação de fertilizantes nitrogenados, químicos ou orgânicos (MILLER & CRAMER, 2004; CHIEN et al., 2009). Finalmente, o balanço das importações de N para a pastagem deve contabilizar o N contido em suplementos alimentares, concentrados e volumosos, utilizados em cada sistema de produção, especialmente na época seca do ano (ALMEIDA, 2001). Na Figura 1, pode ser observada uma representação esquemática dos principais compartimentos e a direção dos fluxos de N em um sistema de pastagem:



**Figura 1.** Diagrama do ciclo do N em uma pastagem. Os compartimentos são mostrados em seus tamanhos relativos: NO (N orgânico do solo); NBM (N na biomassa microbiana); NBF (N da fauna do solo); NBH (N na biomassa de herbívoros); NBP (N na biomassa da pastagem - raízes e parte aérea, 1:1) e NI (N inorgânico na solução do solo -  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Fonte: Modificado de RUSSELLE (1992).

Destaca-se, ainda, que, que, uma parte importante do N está relacionada aos animais e é reciclada sob a forma de fezes e urina (NBH, Figura 1). A importância desta fonte de N, em termos de seu reaproveitamento pela planta forrageira, depende de uma série de fatores, tais como o tipo de animal, o tipo e sistema de manejo do pastejo e o comportamento do animal na pastagem, estando também na dependência de fatores ambientais, topográficos, do solo e ainda, relacionados à qualidade da dieta (CANTARUTTI et al., 2001; MAGIERO, 2004).

O  $\text{NH}_4^+$  é o produto final do processo de decomposição, parte desse nutriente é normalmente incorporado pela microbiota do solo, outra parte é absorvida pelas raízes das plantas como amônio, ou então, havendo ausência de carbono (C), energia e principalmente em condições aeróbicas, as bactérias nitrificadoras (*Nitrossomonas* e *Nitrobacter*) rapidamente oxidam o  $\text{NH}_4^+$  a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e em seguida a  $\text{NO}_3^-$ . O  $\text{NO}_3^-$  então pode ser absorvido, assimilado e temporariamente estocado pelas células vegetais (BELLOW 1995; GLASS et al., 2002).

O N amoniacal possui como característica a elevada solubilidade em água e a grande capacidade de interação com os colóides do solo, não sendo facilmente perdido por percolação no solo. Sua maior desvantagem está associada à possibilidade de perdas gasosas com a volatilização por amônia ( $\text{NH}_3$ ) (MARTHA JUNIOR et al., 2004), assim como ocorre com o  $\text{NO}_3^-$ , sob as formas de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e óxido nítrico (NO), que são perdidos para a atmosfera, contribuindo para o aquecimento global (RECK & HOAG, 1997; SUBBARAO, et al., 2009; SIQUEIRA NETO, et al., 2011). O  $\text{NO}_3^-$  também apresenta elevada solubilidade, mas devido ao seu caráter aniônico, não é retido pelos colóides do solo, deslocando-se em profundidade pelo espaço poroso do solo até atingir o lençol freático, onde se constitui em agente poluidor das águas sub superficiais, com conseqüente contaminação da água (PRIMAVESI, et al. 2006). Na maior parte dos solos, grande parte do N amoniacal oriundo da decomposição da matéria orgânica é oxidado a nitrato, sendo esta forma considerada predominante em solos bem drenados (JARVIS et al., 1995).

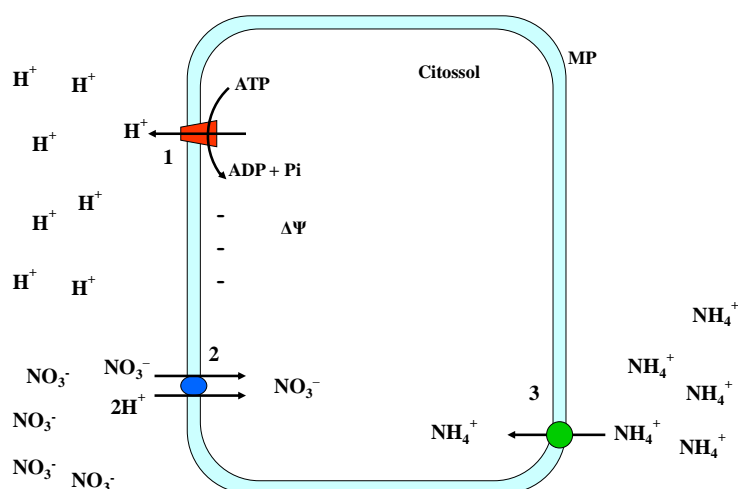
Como tanto o nitrato quanto o amônio podem estar presentes nos solos, uma maior absorção de determinada forma em relação a outra é normalmente acompanhada, ou mesmo favorecida pela variação do pH dos solos (MARSCHNER, 1995; SILVA & VALE, 2000).

Dada a sua importância, o N e sua dinâmica no solo tem sido foco de numerosos estudos (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000), que visam a determinar condições que maximizam o seu aproveitamento pelo vegetal. Um grupo destes estudos tem procurado diminuir as perdas do nitrogênio no solo, bem como melhorar a absorção e a metabolização do N no interior da planta. Nos sistemas de pastagens, o N circula por diversas vias, podendo ser encontrado em diversos níveis de oxidação e de fases do elemento e em todos os compartimentos, que participa (ROSSIELLO et al., 2007). Variações no tamanho do estoque em cada compartimento é produto de adições, perdas e transformações que ocorrem nas plantas (RUSSELLE, 1992; JARVIS et al., 1995).

## 2.2 Aquisição de N pelas Plantas

A aquisição de N pelas raízes das plantas se dá principalmente por suas formas inorgânicas, o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (MARSCHNER, 1995; NÄSHOLM, 2009; MOKHELE et al., 2012).

O transporte através da membrana plasmática para ambas as formas é influenciado pelo pH do meio em associação com a atividade das ATPases (MARSCHNER, 1995). Ao hidrolisar ATP, a enzima bombeia prótons ( $\text{H}^+$ ) para fora da célula, o que gera um gradiente eletroquímico entre o exterior celular (positivo) e o citossol (negativo) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema geral da Absorção de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) através da membrana plasmática vegetal. (1) Bomba de prótons (ATP-ase); (2) Transportador de  $\text{NO}_3^-$ ; (3) Transportador de  $\text{NH}_4^+$ . Fonte: Fernandes (2006).

A produção desse gradiente de  $\text{H}^+$  gera uma força próton motriz que favorece a entrada de cátions na célula. Já a entrada de ânions é desfavorecida pela alta eletronegatividade no citossol que é consequência do gradiente obtido. Portanto, a passagem do íon nitrato através da membrana plasmática é contra o potencial eletroquímico, e, sua entrada na célula está associada ao cotransporte de um ou mais cátions ( $\text{H}^+$ ) para manter a eletroneutralidade no interior da célula (XU et al., 2012).

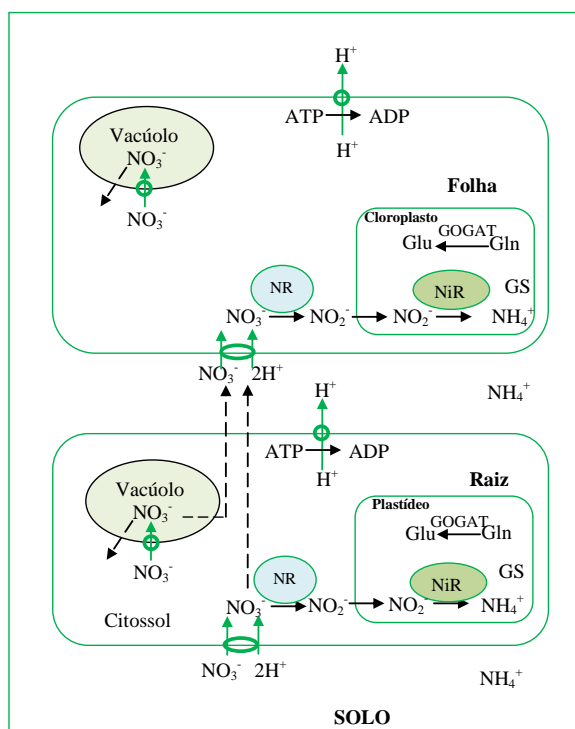
O meio ácido favorece a absorção de nitrato, enquanto que em pH neutro ou alcalino, há o favorecimento da absorção de amônio (XU et al., 2012). Os sistemas de

aquisição de N em plantas são constituídos por transportadores com características cinéticas diferenciadas (em termos de  $K_m$  e  $V_{max}$ ) por estas formas de N. Usualmente, são agrupados em duas classes, de alta ou baixa afinidade, identificados pelas suas siglas em inglês: HATS (*High Affinity Transport System/Sistema de Transporte de Alta Afinidade*) e LATS (*Low Affinity Transport System/Sistema de Transporte de Baixa Afinidade*), respectivamente. No caso do nitrato, os de baixa afinidade são aqueles que funcionam em concentrações elevadas de  $\text{NO}_3^-$ , tipicamente maiores que  $1000 \mu\text{M}$  (BRITTO & KRONZUCKER, 2005), enquanto os HATS funcionam na faixa micromolar, respondendo tipicamente entre  $200 - 500 \mu\text{M}$  (VIDMAR et al., 2000).

### 2.3 Assimilação do Nitrogênio

Após a absorção, o nitrato, deve sofrer redução via NADPH a amônio antes de ser assimilado com esqueletos de carbono. Isso demonstra a existência de uma ligação entre a assimilação de N e a fotossíntese, uma vez que o poder redutor é produto da etapa fotoquímica e os esqueletos de carbono (carboidratos) são produtos da etapa bioquímica da fotossíntese (INSANDE & TOURAINÉ, 1994; SCHEIBLE et al., 1997; FOYER et al., 2003).

A primeira etapa de redução do nitrato a nitrito ocorre no citossol e é catalizada pela enzima redutase do nitrato (NR) (Figura 3). O nitrito passa para os plastídeos quando nas células radiculares ou para o cloroplasto quando na parte aérea, e é então reduzido a amônio pela ação da redutase do nitrito (NiR) com a utilização do poder redutor gerado a partir da via das pentoses fosfato. Para a ocorrência dessas etapas de redução é necessário a transferência de elétrons. Após redução o N é incorporado em aminoácidos (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000).



**Figura 3.** Esquema da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas ( $\text{NO}_3^-$ : nitrato;  $\text{NO}_2^-$ : nitrito;  $\text{NH}_4^+$ : amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; NR: redutase do nitrato; NiR: redutase do nitrito; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase). Fonte: adaptado de Bredemeier & Mundstock (2000).



Estudos com a espécie *Brachiaria radicans* evidenciaram que o aumento das doses de nitrato na solução nutritiva estimulou a atividade da enzima nitrato redutase (CAZETTA & VILLELA, 2004). Outros estudos tem evidenciado que além da concentração de  $\text{NO}_3^-$ , a luz, a temperatura e o pH apresentam grande influencia sobre a atividade desta enzima (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000; OLIVEIRA et al., 2005, MEGDA, 2009).

A avaliação da atividade da NR é importante para o entendimento da assimilação de N, pois essa enzima é considerada como uma das principais limitante neste processo que é dependente da forma e da dose de nitrogênio disponível as plantas, de modo a garantir o contínuo fornecimento de nitrato (KAWACHI et al., 2002).

A assimilação do amônio pelas plantas é importante, pois é uma fonte de N prontamente disponível, em relação ao  $\text{NO}_3^-$  e, em condições de disponibilidade adequada, na assimilação de N por meio de fontes amoniacais ocorre uma economia energética para a planta. Essa energia pode ser direcionada ao crescimento e produção.

Duas enzimas são responsáveis pela assimilação do amônio. Uma delas é a enzima glutamina sintetase (GS) e a outra é a glutamato sintase (GOGAT). Quando a planta se encontra em situações em que um fator essencial para a assimilação do amônio, como por exemplo, energia metabólica, poder redutor (elétrons) e esqueletos de carbono, estejam em déficit, o nitrato absorvido pode ser transportado até outras células, ou armazenado nos vacúolos (Figura 3). No caso do amônio sua assimilação tem que ser realizada nas células da raiz, pois o  $\text{NH}_3$ , em concentrações celulares elevadas pode vir a ser tóxico para a planta, dentre outros, por causar desbalanço no potencial elétrico transmembrana e o desacoplamento na fosforilação oxidativa (BRITTO & KRONZUCKER, 2002).

O amônio liberado no processo de desaminação da glicina na reciclagem do 2-fosfoglicolato produzido quando a RUBISCO opera em sua atividade oxigenase, é normalmente metabolizado, evitando assim a sua toxicidez (OLIVEIRA et al., 2000; XU et al., 2012). Existem relatos de plantas tolerantes a altas concentrações de amônio, como por exemplo, o arroz, que consegue regular o potencial elétrico transmembrana, diminuindo a carga negativa do citossol e consequentemente diminuindo a concentração de amônio no interior da célula (BRITO et al., 2001 a,b; BRITTO & KRONZUCKER, 2002). Entre as plantas forrageiras, o maior destaque é atribuído a espécie *B. humidicola*, que além de apresentar boa adaptação a solos encharcados, ainda produz um metabólito secundário em suas raízes que é capaz de inibir a nitrificação (SUBBARAO, et al., 2009).

## 2.4 Influência do Nitrogênio no Metabolismo e Desenvolvimento Vegetal

A absorção de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  corresponde a maior parte do N prontamente disponível as plantas e garante o grande aporte de N necessário para a síntese de moléculas orgânicas importantes e necessárias a vida (FERREIRA, et al., 2001). Além de influenciar na síntese destas substâncias, o N participa ativamente no crescimento de gramíneas forrageiras, atuando principalmente na sua morfogênese. Apesar destas características normalmente serem determinadas em perfilhos previamente selecionados, tais modificações não estão restritas à plantas individuais, já que seus efeitos em conjunto influenciam o dossel vegetal como um todo (WHITEHEAD, 1995, GASTAL & LEMAIRE, 2002). Portanto, a deficiência do N pode diminuir o crescimento e o desenvolvimento de folhas, caules e raízes das plantas (HOPKINS, 1995; MARSCHNER, 1995).

O estudo de doses de N sobre as características metabólicas, morfogênicas e produtivas tem assumido importante papel no manejo de um grande número de espécies forrageiras (MARTUSCELLO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; GOMIDE, et al., 2011; PREMAZZI et al., 2011; CABRAL et al., 2012; SOUSA et al., 2012). O suprimento de nitrogênio influencia a produção da forragem em nível metabólico, principalmente por fazer parte das proteínas e enzimas diretamente relacionadas à fotossíntese como a ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO) e clorofilas. Além disso, o N influencia ativamente na morfogênese e estrutura das plantas, principalmente sobre o tamanho final da folha, a taxa de crescimento foliar, o índice de área foliar (IAF), o tamanho, peso médio e número de perfilhos (PREMAZZI, et al., 2003; PEREIRA et al., 2012; PAIVA et al., 2012).

Os trabalhos tem evidenciado que o N influencia no crescimento e morfogênese de cada espécie de maneira particular, havendo importante participação das condições ambientais (ANDREWS et al., 1991).

Em relação à forrageiras de clima temperado, como *Lolium perenne*, *L. multiflorum* e *Festuca arundinacea*, a relação existente entre suprimento de N e incrementos nas taxas de crescimento são bem descritos em literatura (ROBSON & DEACON, 1978; PEARSE & WILMAN, 1984; GASTAL et al., 1992).

Para forrageiras tropicais, com metabolismo fotossintético do tipo C<sub>4</sub>, as pesquisas confirmam a ação do nitrogênio de modo ainda mais ativo na morfogênese e crescimento de uma grande variedade de plantas forrageiras como para as espécies *Panicum maximum* cv. Mombaça, cv. Tanzânia e cv. Massai (GARCEZ NETO et al., 2002; MARTUSCELLO et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2007), para *Urochloa brizantha* cv. Marandu, cv. Xaraés e cv. Piatã (ALEXANDRINO et al., 2004; MARTUSCELLO et al., 2005; MEGDA & MONTEIRO, 2010, PAIVA et al., 2012, SOUSA et al., 2012), para *Pennisetum purpureum* (GOMIDE et al., 2011) e para o capim Tifton 85 (PREMAZZI et al., 2011, PEREIRA et al., 2012).

Para o capim Tifton 85 especificamente, uma gramínea forrageira de ciclo fotossintético do tipo C<sub>4</sub> de elevado potencial de resposta à adubação nitrogenada, o N proporciona variação positiva no comprimento foliar, na área da lâmina foliar, na taxa de alongamento da folha e no Índice de Área Foliar (IAF), sendo os maiores incrementos no crescimento foliar, observadas entre o controle (sem N) e a dose de 80mg N kg<sup>-1</sup> de solo (PREMAZZI et al., 2011).

## 2.5 Acúmulo Foliar e Intoxicação de Bovinos por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Para a assimilação do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorvido pelo sistema radicular, a planta, consome uma grande parte do poder redutor produzido durante a fotossíntese (aproximadamente 25%). Desta forma, plantas cultivadas em solos onde ocorre ampla predominância de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e sob condições climáticas que favorecem o baixo nível de radiação incidente, esse nutriente pode ser temporariamente absorvido e armazenado no vacúolo celular das células vegetais. Diferente das plantas anuais, como o arroz e o milho, em espécies forrageiras essa característica pode representar um elevado risco aos animais, principalmente se a espécie forrageira apresenta o acúmulo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> preferencialmente nas folhas, ou outras partes comestíveis por animais ruminantes como as bainhas foliares e as porções mais finas dos colmos. Para evitar o acúmulo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em partes comestíveis das plantas, é fundamental que as duas enzimas relacionadas ao metabolismo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estejam com elevada atividade.

No Brasil, alguns surtos de mortandades de bovinos causadas por altas concentrações de nitratos nas plantas têm sido descritas não somente em gramíneas

anuais como aveia e azevém, ocorridos em pastagens excessivamente adubadas na região sul (JÖNCK, 2010), como também em forrageiras perenes como o capim mandante (*Echinochloa polystachya*) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*), adubadas com esterco bovino na região nordeste (MEDEIROS, et al., 2003). Neste último caso, os autores sugerem que houve grande influência do fluxo sazonal de nitrato, que ocorre logo nas primeiras chuvas, após períodos prolongados de estiagem, e também pela influência da adubação orgânica em excesso.

Elevados teores de nitrato são prejudiciais, principalmente pelo fato deste nutriente ser transformado ao nível de rúmen a nitrito, podendo ser absorvido pela mucosa ruminal, onde chega à corrente sanguínea e interage fortemente com o grupo heme da hemoglobina, que é oxidada do estado ferroso ( $\text{Fe}_2^+$ ) para o estado férrico ( $\text{Fe}_3^+$ ), passando a se chamar metemoglobina. Essa por sua vez não carrega oxigênio ( $\text{O}_2$ ) para os tecidos, resultando nos sinais clínicos característicos observados nos animais de hipóxia e anóxia tecidual (RADOSTITS, 2000; JÖNCK, 2010).

Em termos de sensibilidade à intoxicações por nitratos/nitritos, as espécies animais consideradas mais sensíveis são: os suínos, bovinos, ovinos e equinos (JÖNCK, 2010). Jönck em 2010 revisou mais de 45 casos de mortes de bovinos intoxicados por  $\text{NO}_3^-$ , em pastagens de aveia e azevém adubadas com altas doses de N mineral ou com esterco suíno. Neste estudo, determinações de teores de nitrato nas pastagens onde foram registradas intoxicação e morte de bovinos revelaram que a faixa tóxica é bastante ampla e elevada. Sendo observada mortalidade de bovinos alimentados com pastos com teores de  $\text{NO}_3^-$  acima de 3003mg/kg de  $\text{NO}_3^-$ .

## 2.6 Toxidez pelo Amônio em Plantas

Assim como ocorre com o acúmulo de nitrato nos tecidos das plantas, a utilização de elevadas doses de N, em pastagens manejadas intensivamente, em condições edáficas propícias, podem em maior ou menor tempo e dose favorecer a ocorrência de sintomas de toxidez de amônio em plantas. Tal situação pode ser favorecida quando são utilizadas principalmente fontes de N de origem amoniacal (BRITO & KRONZUCKER, 2002).

O amônio afeta desde a germinação, o estabelecimento, o crescimento e a produção das plantas, sendo mais comum a ocorrência deste evento quando o amônio é a única forma disponível de N as plantas (WESTWOOD & FOLY, 1999; ZHANG & RENGEL, 2000; BRITO & KRONZUCKER, 2002).

Outro fator importante no estudo da toxidez do amônio em plantas é a tolerância ou sensibilidade observada em função de cada espécie. Dentre as espécies vegetais mais sensíveis a amônio temos a cevada, a batata e o feijão (FERNANDES & ROSSIELLO, 1986; ZHU et al., 2000; BRITO et al., 2001b). Também são reconhecidas espécies tolerantes a maiores concentrações de amônio como a mandioca e poaceae como o arroz e as forrageiras *Urochloa humidicola*; *U. decumbens* e *Paspalum notatum* (SAHRAWAT & KEENEY, 1984; FERNANDES & ROSSIELLO, 1986; SUBBARAO et al., 2000; CRUZ et al., 2006; ARAUJO, et al., 2009). Nesse sentido, Shan et al., (2012), relataram que diferentes espécies, ou até mesmo genótipos de uma mesma espécie, podem apresentar preferências por nitrato ou amônio, conforme as pressões seletivas e consequentes adaptações fisiológicas.

Em condições onde a fotossíntese e a produção de carboidratos são prejudicadas, ocorre a diminuição de assimilação do amônio pela falta de esqueletos de carbono, reduzindo assim o crescimento das plantas (BRITTO & KRONZUCKER, 2002; RUAN et al., 2007). Uma das formas de monitorar a ocorrência de toxidez aguda por amônio é

através do acúmulo de aminoácidos livres, principalmente glutamina e asparagina, que por apresentarem uma baixa relação C:N são utilizadas pelas plantas para a detoxificação de níveis citossólicos potencialmente tóxicos do  $\text{NH}_4^+$ . Esses aminoácidos são sintetizados pela planta em resposta à elevada disponibilidade de amônio em relação à disponibilidade de carboidratos, uma vez que apresentam uma baixa relação C:N (5:2 e 4:2, respectivamente) (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em área pertencente à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no Instituto de Agronomia, localizado no município de Seropédica, RJ (22°45'53'' S, 43°41'56''W e 33m de altitude). O clima local enquadra-se no tipo Aw da classificação de Köppen, correspondente a tropical com estação seca bem definida.

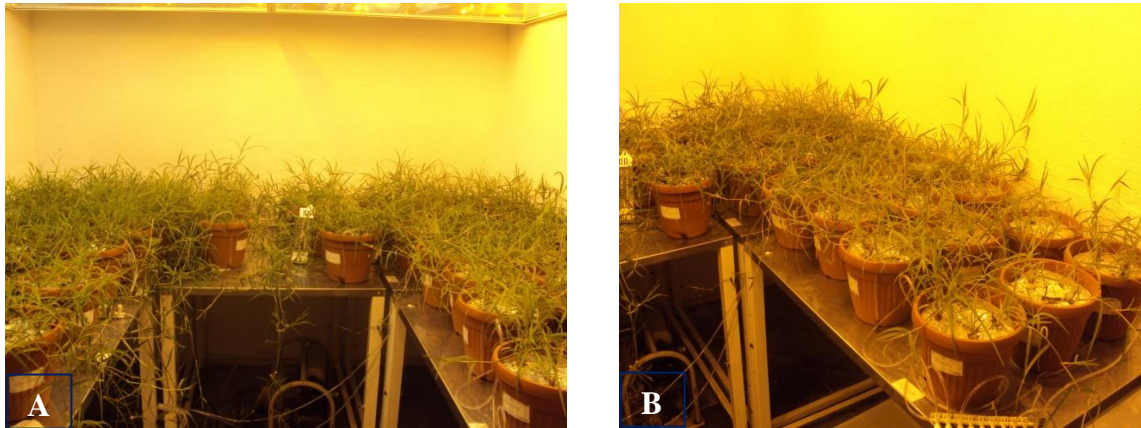
Para atender aos objetivos propostos, foram conduzidos dois experimentos, ambos em ambientes protegidos, sob condições ambientais pré-fixadas (Experimento I, câmara de crescimento, cultura hidropônica) ou semi-controladas (Experimento II, casa de vegetação, com terra fina como substrato). O cultivo das plantas foi realizado durante o período março-julho de 2010.

#### 3.1 Obtenção de Propágulos

Para obtenção dos propágulos procedeu-se à colheita de estolões sadios do capim, oriundos de uma área experimental próxima, situada na Estação Experimental de Parasitologia (IV/UFRRJ) sobre Planossolo Háplico. Essa área vem sendo utilizada desde 2006, tendo sido desenvolvidos nela diversos projetos relacionados com a avaliação de características ecofisiológicas e produtivas do capim Tifton 85 sob adubação nitrogenada (GALZERANO et al., 2008; BARBIERI JUNIOR, 2009; BARBIERI JUNIOR et al., 2010 e 2012; SILVA, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2011). Os melhores perfilhos, com raízes basais emitidas, foram destacados, lavados e transplantados em bandejas contendo areia lavada e autoclavada como substrato. As bandejas foram alocadas em ambiente mantido à sombra, dentro de casa de vegetação, durante duas semanas. Subsequentemente foram submetidos a uma nova seleção visando a máxima uniformização do material clonal utilizado nos experimentos.

#### 3.2 Experimento I – Câmara de Crescimento (*Fitotron*)

O experimento foi conduzido em sistema hidropônico, em ambiente controlado, utilizando-se para tal uma câmara climatizada (*fitotron*), localizada nas dependências do Departamento de Solos da UFRRJ. O sistema hidropônico foi ligado a um sistema de arejamento descontínuo, ativado com frequência de 20 minutos/hora, proporcionando a oxigenação necessária para 64 vasos (1,7 L de solução nutritiva, 4 pl/vaso) (Figura 4).



**Figura 4.** Disposição das mudas dentro da câmara de crescimento A. Vista geral dos vasos dentro do *fitotron*. B. Outro ângulo mostrando as plantas dispostas nas bancadas, a 1,0 m de altura.

### 3.2.1 Tratamentos

O experimento envolveu o uso das duas principais formas de N utilizadas pelas plantas forrageiras, o nitrato ( $N-NO_3^-$ ) e o amônio ( $N-NH_4^+$ ) (JARVIS et al., 1995). Essas formas foram combinadas em quatro doses, a saber: 0,5; 2,0; 5,0 e 10,0 mM de N, respectivamente.

A terceira variável experimental considerada foi o fator tempo, expresso na forma de dias após um corte de uniformização (DAC), considerado como dia zero. A duração do período experimental foi determinada pela experiência prévia de campo, em que um ciclo de rebrota do capim, até atingir 95% de interceptação da radiação fotossinteticamente ativa, sob as condições ambientais vigentes durante os meses de dezembro a fevereiro, tem extensão de 28 a 35 dias (BARBIERI JUNIOR, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2011). Assim, foram definidas quatro datas: 14, 21, 28 e 35 DAC, respectivamente. Cada tratamento foi repetido quatro vezes, totalizando 128 vasos ( $2 \times 4 \times 4 \times 4$ ), que foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (Forma de N x Dose x Época). Todavia, pelas dimensões reduzidas da câmara de crescimento (Figura 4) não foi possível alocar todos os 128 vasos simultaneamente, sendo feitas duas baterias sucessivas de cultivo, com 64 vasos cada, correspondentes à forma nítrica ou amoniacal, respectivamente (ver item 3.2.2).

As soluções nutritivas foram trocadas a cada quatro dias. O pH das soluções foi ajustado, a cada dois dias, a um valor de 5,8, para compensar variações devidas à absorção iônica, utilizando-se quantidades apropriadas de soluções diluídas de  $H_2SO_4$  ou NaOH. O volume da solução nutritiva dentro dos vasos foi controlado diariamente, sendo repostado a cada dois dias, na primeira semana, e diariamente, posteriormente. A oxigenação da solução nutritiva foi realizada por meio de uma bomba de ar, acoplada a um sistema de mangueiras, conectadas a cada vaso via uma mangueira de arejamento acoplada a uma pedra porosa de sílica normalmente utilizada em aquicultura.

### 3.2.2 Ajuste das condições ambientais de cultivo

O experimento foi dividido em duas etapas, sendo a primeira com a forma N-nitrato e uma segunda etapa com a forma  $N-NH_4^+$ . Do ponto de vista experimental, ambos os experimentos são diretamente comparáveis, uma vez que o ambiente da

câmara de crescimento foi controlado com programa ajustado para proporcionar os seguintes parâmetros ambientais: a) Irradiância fotossintética: 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; b) fotoperíodo: 12/12 h (diurna/noturna); c) temperatura ambiente: 30/24° C (diurna/noturna); d) umidade relativa do ar: 70%.

### 3.2.3 Composição da solução nutritiva.

A solução nutritiva utilizada foi a de Hoagland & Arnon (1950). Nas tabelas 1, 2 e 3 relacionam-se os sais utilizados nas soluções estoques dos micro e macronutrientes, além das fontes de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  utilizadas:  $\text{Ca (NO}_3)_2$  e  $\text{KNO}_3$  para a forma nítrica e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para a forma amoniacal, com grau de pureza de reagente analítico (Vetec® e Sinthy®).

As avaliações estruturais, nutricionais e análises de metabolismo seguiram a mesma metodologia para os experimentos e as mesmas são detalhadas no tópico “determinações experimentais”.

**Tabela 1.** Formulação da solução de micronutrientes utilizada no experimento para solução nutritiva.

Ingredientes	Solução de Micronutrientes
	$\text{g L}^{-1}$
Ácido Bórico (B)	2,86
Sulfato de Cobre. $5\text{H}_2\text{O}$ (Cu)	0,0079
Sulfato de Manganês (Mn)	2,512
Sulfato de Zinco. $7\text{H}_2\text{O}$ (Zn)	0,220
Molibdato de Sódio. $2\text{H}_2\text{O}$ (Mo)	0,0246

**Tabela 2.** Formulação da solução de nutritiva (macronutrientes) utilizada, na avaliação da forma N-nitrato como fonte de N.

Ingredientes	Soluções Nutritivas ( $\text{g 38L}^{-1}$ )			
	0,5mM	2,0mM	5,0mM	10,0mM
Sulfato de Mg. Heptahidratado	18,5	18,5	18,5	18,5
Nitrato de Potássio	0	0	0	7,96
Nitrato de Cálcio Tetraidratado	2,24	8,97	22,44	35,87
Fosfato Potássio dibásico	6,62	6,62	6,62	6,62
Sulfato de Potássio	13,19	13,19	13,19	6,33
Sulfato de Cálcio dihidratado	24,53	19,62	9,80	0
Ferro (FeDDHMA)	1,266	1,266	1,266	1,266
Micro (- Fe) (mL)	38	38	38	38

**Tabela 3.** Formulação da solução de nutritiva (macronutrientes) utilizada, na avaliação da forma N-amônio como fonte de N.

Ingredientes	Soluções Nutritivas (g 38L <sup>-1</sup> )			
	0,5Mm	2,0mM	5,0mM	10,0mM
Sulfato de Mg. Heptahidratado	18,5	18,5	18,5	18,5
Sulfato de amônio	1,25	5,02	12,55	25,09
Fosfato Potássio dibásico	6,62	6,62	6,62	6,62
Sulfato de Potássio	13,19	13,19	13,19	13,19
Sulfato de Cálcio dihidratado	20,65	20,65	20,65	20,65
Ferro (FeDDHMA)	1,266	1,266	1,266	1,266
Micro (-Fe) (mL)	38	38	38	38

### 3.3. Experimento II - Casa de Vegetação

Mudas enraizadas, conforme descrito previamente, foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 10 Kg de solo. O solo utilizado como substrato foi coletado na mesma área experimental de onde foram obtidos os propágulos (item 3.1) classificado como Planossolo Háplico, de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2006).

Previamente à coleta do solo, em março de 2010, foi realizada uma amostragem na mesma camada em que o substrato foi coletado (0,0-0,20 m). Os dados analíticos de rotina foram obtidos no Laboratório de Fertilidade de Solos, Plantas e Resíduos da UFRRJ (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise química da camada arável (0-0,2 m) do Planossolo Háplico utilizado no experimento II.

Prof. (m)	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	H+Al	V	P <sup>(*)</sup>	M.O. <sup>(**)</sup>	pH
	(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )				(%)	(mg/dm <sup>3</sup> )	(g/kg)	(água,1:2,5)
0,0-0,2	1,8	1,0	0,09	2,1	55	40	1,3	6,2

(\*) P disponível (Mehlich-1) (\*\*) C orgânico (Walkey-Black) x 1,72.

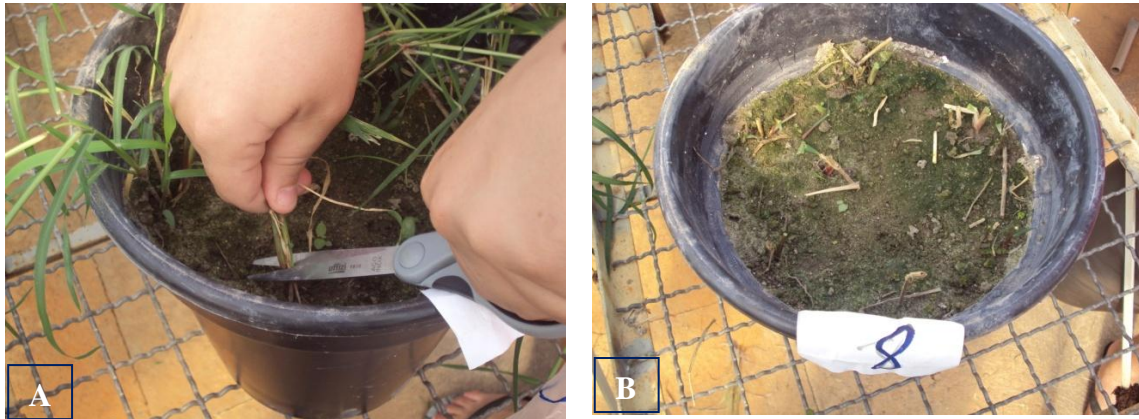
Após a coleta, o solo foi seco a sombra e peneirado em malha de 2 mm, sendo em seguida homogeneizado, pesado e colocado nos vasos.

Uma adubação basal com solução de micronutrientes (Tabela 1) foi realizada previamente ao plantio das mudas. Em seguida água deionizada foi adicionada até que o solo atingisse a sua capacidade de campo. A perda de umidade dos vasos foi repostada diariamente.

As mudas (cinco por vaso) foram transplantadas ao final da tarde, sob temperatura mais amena. Três semanas após o transplante, foi realizado um corte de uniformização, a uma altura de 2-3 cm da base do colmo (Figura 5), sendo a seguir aplicados os tratamentos experimentais.

Os tratamentos foram compostos de quatro doses de N: zero, 80, 160 e 240 mg N kg<sup>-1</sup> de solo e de quatro épocas de coleta: 14, 21, 28 e 35DAC. Como fonte de N foi utilizado Nitrato de Amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>).





**Figura 5.** A) Corte de uniformização do capim, na casa de vegetação; B) Aspecto dos vasos após o corte de uniformização.

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4x4 (Época x Doses x Repetições). Durante as amostragens, os vasos foram identificados conforme o tratamento, para facilitar o manuseio das amostras (Figura 6).



**Figura 6.** Vista parcial do experimento II, mostrando a disposição dos vasos na casa de vegetação.

### 3.4 Determinações Experimentais

Durante as amostragens, foram determinadas características metabólicas e produtivas da forrageira. Em cada amostragem, foram realizadas as seguintes determinações: teor de clorofila (extraída diretamente), Índice de Clorofila Falker (ICF),  $N-NO_3^-$ ,  $N-NH_4^+$ , N-amino livre e açúcares solúveis, atividade da nitrato redutase, N total e produção de massa fresca e seca dos componentes da parte aérea (lâminas foliares, bainhas foliares e colmos).

### 3.4.1 Atividade da nitrato redutase

A atividade foi determinada segundo metodologia de Jaworski (1971). Para determinação da atividade da enzima nitrato redutase (ANR) foram pesados amostras de 200mg de tecido vegetal fresco e incubados em 5 mL de tampão fosfato contendo  $\text{KNO}_3$ . Após incubação por 60 minutos a  $30^\circ\text{C}$  em banho maria termoprocessado, o nitrito produzido foi quantificado espectrofotometricamente, a  $\lambda = 540\text{nm}$ , contra uma curva padrão de nitrito de sódio.

### 3.4.2 $\text{N-NO}_3^-$ , $\text{N-NH}_4^+$ , N-amino livre e açúcares solúveis

Para a determinação das frações solúveis do N e de açúcares solúveis, foi preparado um extrato alcoólico segundo Fernandes (1976). Para tal, foram coletados 0,5 g de massa verde de lâminas foliares (terço médio), bainhas, colmos e raízes. O material foi conservado em etanol 80% e mantido sob refrigeração até o momento da sua extração, consistente em maceração e fracionamento por partição de fases em clorofórmio. O conteúdo de aminoácidos livres foi determinado pelo método de Yemm & Cocking (1955);  $\text{N-NH}_4^+$  segundo Felker (1977) e  $\text{N-NO}_3^-$  de acordo com Cataldo et al. (1975). Os açúcares solúveis foram quantificados no mesmo extrato, segundo Yemm & Willis (1954).

### 3.4.3 Índice de clorofila (ICF)

Foram feitas determinações indiretas do teor de clorofila foliar, utilizando cinco lâminas foliares do capim, sempre a segunda ou terceira (quando necessário), a partir do ápice. Em cada lâmina foram feitas três leituras, na sua porção média da folha. Foi utilizado um medidor eletrônico (clorofilômetro marca ClorofiLOG<sup>®</sup> modelo CFL 1030, FALKER-Automação Agrícola, Porto Alegre). Este aparelho fornece valores de clorofila *a*, *b* e total, expressos em uma unidade chamada de Índice de Clorofila Falker (ICF). Maiores detalhes sobre o seu uso são informados por Barbieri Junior et al. (2012).

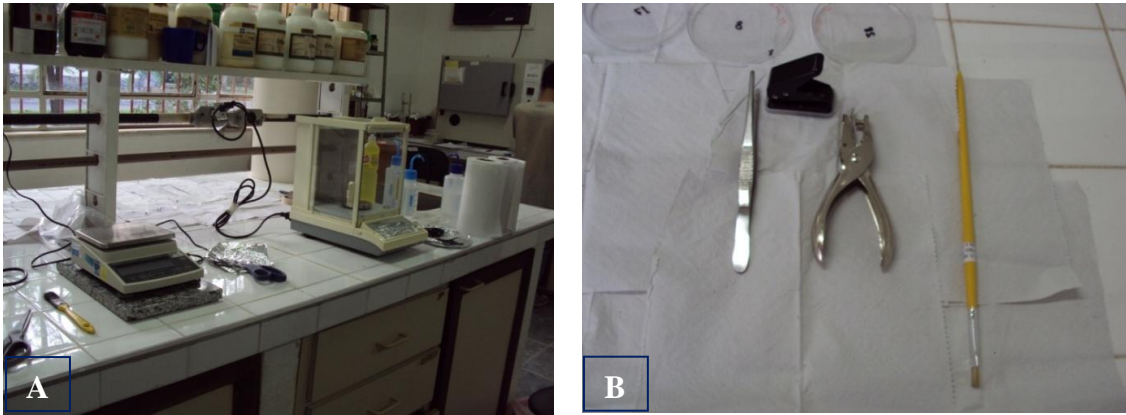
### 3.4.4 Quantificação de clorofilas por extração direta

Os teores de clorofila foram determinados a partir da extração, em cinco lâminas foliares intactas, de dois discos com 6mm de diâmetro (Figura 7B), tirados da porção média da folha (BARBIERI JUNIOR et al., 2010). Como solvente extrator, utilizou-se N, N Dimetilformamida (DMF, espectroscópica, Vetec, RJ) conforme Moran (1982). As folhas utilizadas para extração dos discos foliares foram as mesmas que previamente foram analisadas pelo clorofilômetro. As absorbâncias dos extratos foram analisadas em Espectrofotômetro UV-Visível marca Biospectro modelo SP 220, nos comprimentos de onda indicados no método de Moran (1982), conforme as equações a seguir:

$$\text{Clor a} = 12,64 \times (A_{664}) - 2,99 \times (A_{647})$$

$$\text{Clor b} = 23,26 \times (A_{647}) - 5,6 \times (A_{664})$$

$$\text{Clor t (a+b)} = 7,04 \times (A_{664}) + 20,27 \times (A_{647})$$



**Figura 7.** A. Detalhe do laboratório onde foram realizadas as determinações analíticas. B. Instrumentos utilizados na retirada dos discos foliares.

### 3.4.5 N-total

Lâminas foliares, colmos, bainhas e raízes foram coletadas e postas a secar em estufa ventilada ( $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ ; 72 horas), sendo em seguida moídas em moinho tipo Wiley, com peneira de 1 mm. Para a determinação dos teores de N total, as mostras passaram por digestão sulfúrica conforme Tedesco et al. (1995). Alíquotas do material digerido foram transferidas para tubo de destilação (25 x 250 mm) do destilador de amônio (Kjeldahl) por arraste a vapor, adicionando-se 10 mL de NaOH 10M através do destilador. O destilado foi titulado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,025 M padronizado, utilizando-se ácido bórico como indicador.

### 3.4.6 Produção de massa seca fresca e seca

A massa total produzida pelo capim assim como a sua partição nas diversas frações (lâminas foliares, bainhas, colmos e raízes) foi determinada ao longo do ciclo de rebrota através de avaliações semanais, aos 14, 21, 28 e 35 dias após um corte de uniformização (DAC), realizado no início do experimento. O corte foi realizado com auxílio de uma tesoura e consistiu da remoção de toda parte aérea, tal como feito no experimento I (Figura 5A). O material coletado foi colocado em sacos plásticos, acondicionados em caixa isotérmica, e tão rapidamente quanto possível, foram levados ao laboratório (Figura 7A), para fracionamento dos componentes morfológicos. Após a coleta da parte aérea, foi realizada a separação das raízes do solo. Subsequentemente, foram submetidas à lavagem repetida para retirada de partículas de terra aderida. No caso das raízes desenvolvidas em condições de câmara de crescimento, as mesmas foram imersas em água destilada, em cinco potes de forma sequencial, no intuito de remover resíduos a partir da camada de solução “não perturbada” que sempre rodeia as raízes cultivadas em solução nutritiva (CLARKSON, 1996).

Após separação morfológica, a massa fresca de cada componente foi registrada em balança com duas casas decimais e em seguida foram retiradas amostras para obtenção das frações solúveis. Em seguida, o material foi colocado para secar em estufa ventilada, a  $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ , por 72 horas, com posterior pesagem em balança de duas casas decimais. A partir da soma do peso seco de cada componente morfológico foram obtidos os valores de massa seca total de cada tratamento.

### 3.5. Análises Estatísticas

As análises dos dados primários foram guiadas inicialmente pela análise de variância, a qual separou efeitos devidos a tratamentos (Forma de N; doses de N, e dias após corte) e suas interações (Forma x Dose; Forma x Época e Dose x Época), procedendo-se aos desdobramentos, quando indicado, conforme os procedimentos do programa SAS versão 9.0 (2002). As médias foram discriminadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

No caso dos tratamentos de caráter quantitativo procedeu-se à análise de regressão. Para tal foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 5.0 for Windows (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2003), selecionando-se dentro dos modelos disponíveis, os mais adequados para cada situação, levando-se em consideração o coeficiente de determinação das equações de regressão, a expectativa biológica e a experiência prévia em relação ao capim Tifton 85. No caso do modelo puramente exponencial, a taxa de crescimento relativo ( $T.C.R. = 1/Y \cdot dY/dt$ ) assume um valor constante (HUNT, 1978), dado pelo coeficiente K ( $Y = A \cdot \exp[-K \cdot t]$ ), onde Y é a variável ligada a crescimento, A e K são parâmetros de ajuste e T = DAC).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

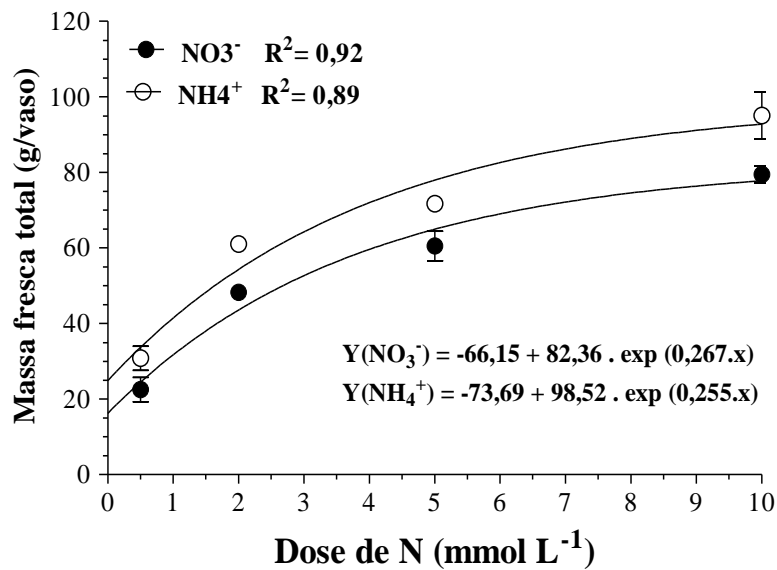
O propósito principal dos tratamentos estudados foi o de induzir gradientes adequados de disponibilidade de N para a nutrição do capim Tifton-85 sob as condições ambientais vigentes nos experimentos realizados. Nesse sentido, é de interesse observar que a literatura registra uma ampla faixa de concentrações de N solúvel extraível, com referências a concentrações de até 20 mM de  $\text{NH}_4^+$  e de 1 a 5 mM de  $\text{NO}_3^-$ , em solos de diversos ecossistemas agrícolas e pastoris (JARVIS et al., 1995; MAGIERO, 2004; MILLER & CRAMER, 2004; ROSSIELLO et al., 2007). Há referências a concentrações muito mais elevadas em certos ecossistemas naturais (GLASS et al., 2002), onde fatores como baixo pH, baixas temperaturas, acumulação de compostos alelopáticos de natureza fenólica ou excesso de umidade inibem a nitrificação e resultam em acumulação de  $\text{NH}_4^+$  nos solos (FERNANDES, 1990; BRITTO & KRONZUCKER, 2002 e 2005; GLASS et al., 2002; HOLZSCHUH et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012).

### 4.1 Experimentação em Ambiente Controlado (Experimento I)

#### 4.1.1 Massa fresca

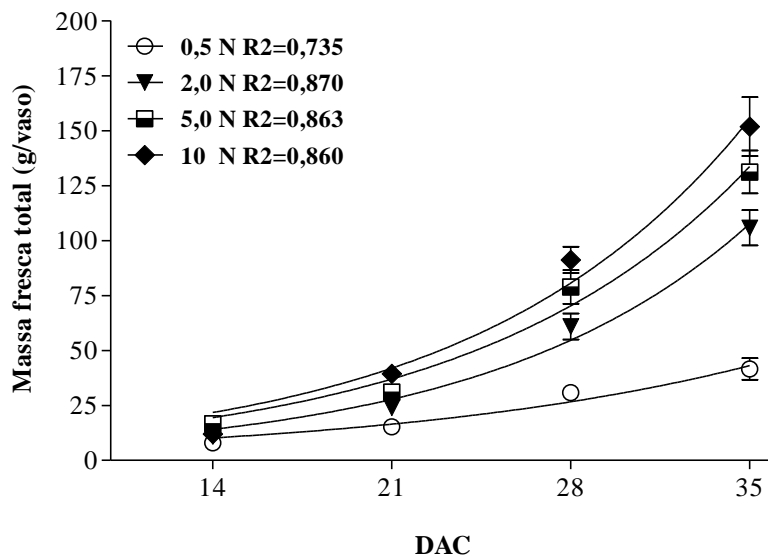
A análise de variância para os valores relativos à massa fresca total das plantas indicou efeitos significativos (teste F) para as variáveis: forma de N ( $p=0,0207$ ); dose ( $p<0,0001$ ) e DAC ( $p<0,0001$ ), assim como para as interações simples forma x dose ( $p=0,0018$ , Fig. 8), forma x DAC ( $p=0,00136$ ) e dose x DAC ( $p<0,0001$ , Fig. 9). Independentemente de doses e dias de avaliação, plantas sob nutrição amoniacal produziram, em média, 10,2% ( $p<0,05$ ) a mais do que plantas sob nitrato (55,94 vs. 50,27 g vaso<sup>-1</sup>, respectivamente). Esse resultado corrobora todo o corpo de pesquisas prévias, indicativas de que, além da quantidade suprida, a forma de N disponível as plantas exerce efeitos significativos sobre o crescimento vegetal (CRAMER & LEWIS, 1993; KRONZUCKER et al., 1999; ZHOU et al., 2011).

Os dados relativos à interação entre formas e doses de N aplicadas são apresentados na Figura 8. Dentro das opções disponíveis no *software* Graph Pad Prism, foi selecionado um modelo exponencial da forma:  $Y = A + B \exp(-K \cdot x)$  para o ajuste dos pontos correspondentes a ambas as formas de N. Nesse modelo, a ordenada à origem vale a soma das constantes (A+B). A partir desse ponto, os dados convergem para um valor máximo superior ou *plateau* (A), a uma taxa constante (K), para dar conta do fato dos valores não apresentarem tendência definida de queda na faixa de doses aplicadas. Isto possivelmente seja devido a que, de acordo com o conceito de demanda metabólica (TOURAINÉ et al., 1994; GASTAL & LEMAIRE, 2002; SCHEURWATER et al., 2002; MACDUFF & BAKKEN, 2003; KUSSOW et al., 2012), as plantas tenham atingido a sua máxima taxa de crescimento com a máxima dose de N aplicada, dentro dos limites de regime de irradiância fotossintética e temperaturas impostos no presente experimento. De acordo com Macduff & Bakken (2003), o acoplamento entre absorção de N e crescimento fica mais aparente quando avaliado em períodos de tempo que vão de dias a semanas, tal como no presente caso. Curvas similares às da Figura 8 foram obtidas por Silveira et al. (2007), ao estudar o efeito de doses e fontes de N sobre a produção forrageira da cultivar “Coastal bermudagrass” (*Cynodon dactylon* (L.) Pers), em condições de campo.



**Figura 8.** Variação da massa fresca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

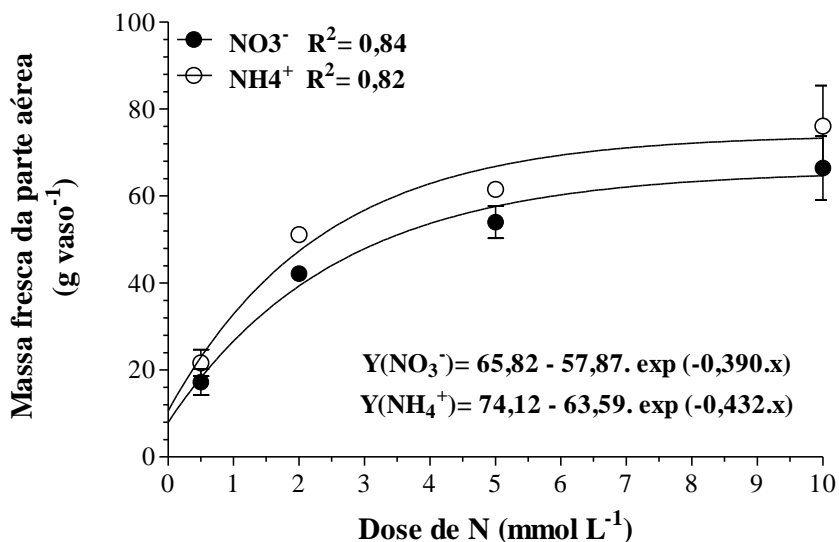
Na figura 9, apresenta-se o efeito da interação entre as doses de N aplicadas e as datas de amostragem, expressas como DAC, independentemente das formas de N mineral utilizadas.



**Figura 9.** Variação temporal da massa fresca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=8$  repetições por tratamento.

Em todos os casos, o padrão de variação temporal ficou descrito por uma equação exponencial simples, a qual explicou acima de 86% da variabilidade total, exceção feita da menor dose de aplicação ( $R^2=0,735$ ).

A análise de variância para os valores relativos à massa fresca da parte aérea indicaram efeitos significativos para doses de N e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações forma de N x dose ( $p < 0,0001$ ) e forma x DAC ( $p < 0,0001$ ). Na figura 10 são apresentados os valores de produção de massa fresca da parte aérea em função de forma e dose de N.

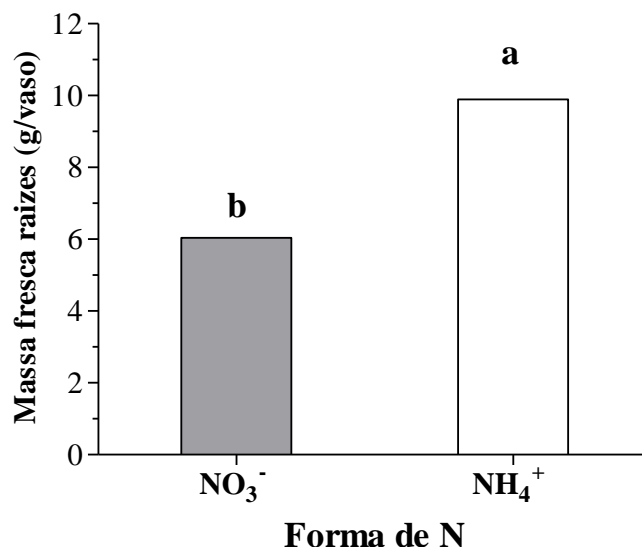


**Figura 10.** Variação da massa fresca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

Clement et al. (1978) observaram que quando as concentrações de  $\text{NO}_3^-$  disponíveis a plantas de azevém (*Lolium perenne*) variaram por um fator de  $10^3$  (entre 0, 2 e 200  $\text{mg N L}^{-1} \approx 14,3 \mu\text{M}$  e 14,3  $\text{mM}$ , respectivamente), o crescimento vegetal foi afetado de forma modesta, enquanto que as concentrações tissulares de N permaneceram essencialmente constantes. Embora esses resultados não possam ser comparados diretamente com o presente caso, devido às diferenças em metabolismo fotossintético entre as espécies, o mesmo ilustra a ampla capacidade de regulação que o metabolismo nitrogenado pode exercer sobre as taxas de absorção de N.

A análise de variância para os valores relativos à massa fresca das raízes indicaram efeitos significativos para formas de N ( $p < 0,0001$ ); dose ( $p = 0,0009$ ) e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações simples forma de N x dose ( $p < 0,0001$ ); forma x DAC ( $p = 0,0010$ ) e dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Na média geral, os tratamentos que levaram amônio superaram os correspondentes ao nitrato em quase 40% (Figura 11).

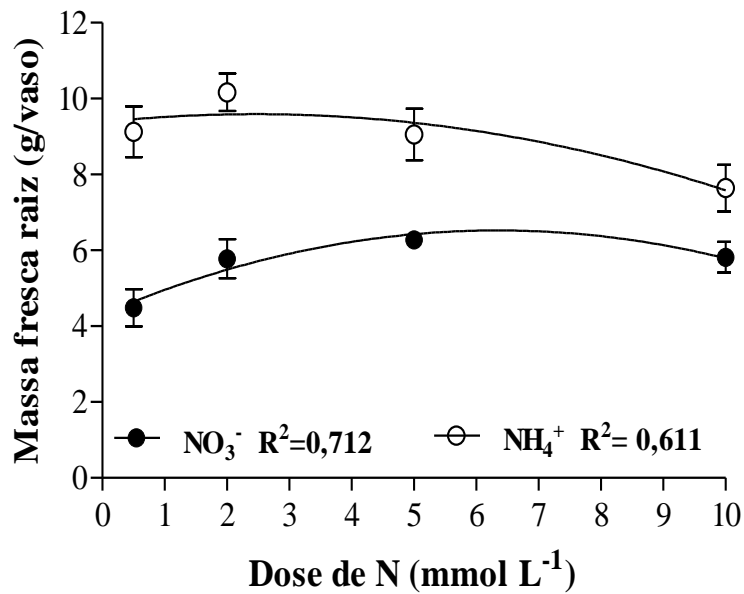




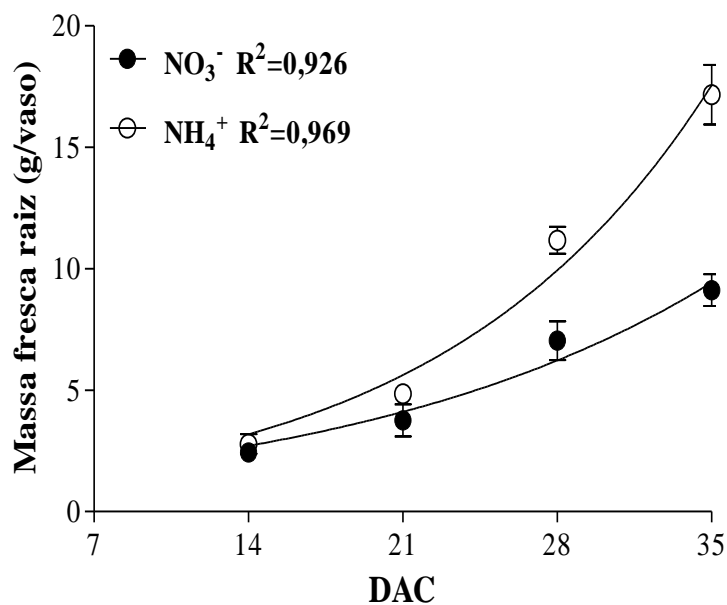
**Figura 11.** Massa fresca radicular média, produzida pelo capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, com duas formas e quatro doses de N mineral. Médias: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 6,03 ± 0,255 g/vaso; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 9,89 ± 0,241 g/vaso.

O desdobramento da interação fonte x dose é mostrada na figura 12. As curvas de melhor ajuste neste caso foram de tipo quadrático, mas por comparação com as correspondentes à massa fresca total (Fig. 8) pode-se inferir que as tendências de variação são bastante similares, com as doses tendo uma influencia limitada no crescimento das raízes. Também fica evidente que a superioridade da fonte amoniacal estende-se através de toda a faixa de concentrações de N aplicadas, mas o contraste é máximo entre 0,5-2,0 mM. Com aumentos subsequentes da concentração externa, as curvas tendem à convergência. Também, o curso temporal do crescimento radicular com base na massa fresca (Fig.13), o qual reproduz o comportamento exponencial já visto na massa fresca total (Fig. 9), resultou mais favorecido com nutrição amoniacal, como evidenciam as diferenças em taxas de crescimento, entre ambas às formas. Não obstante essa superioridade da fonte amoniacal, observaram-se modificações morfológicas nas raízes cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na maior dose de N aplicada (Fig. 14).





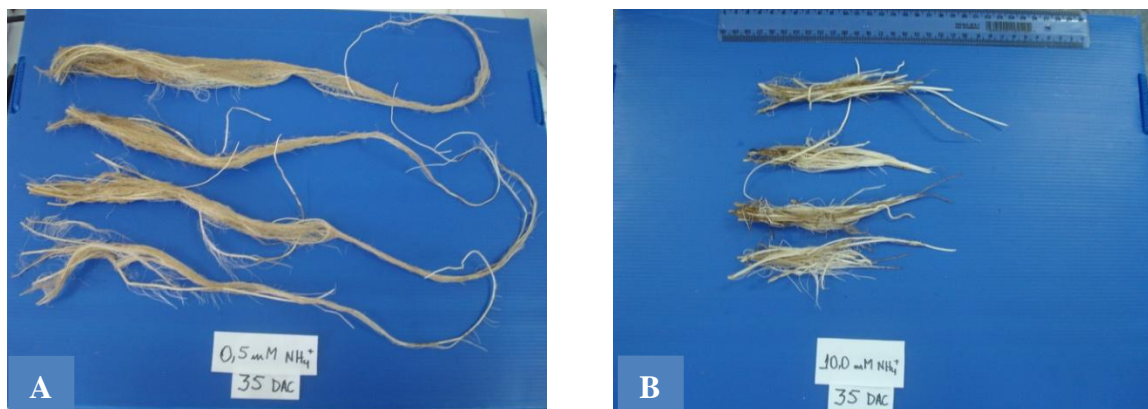
**Figura 12.** Massa fresca radicular produzida pelo capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas e quatro doses de N mineral. Barra vertical indica erro padrão de  $n=16$  repetições por tratamento.



**Figura 13.** Variação temporal da massa fresca radicular produzida pelo capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas e quatro doses de N mineral. As taxas de crescimento são: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 59,4 e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 81,3 mg g<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, respectivamente. Barra vertical indica erro padrão de  $n= 8$  repetições por tratamento.

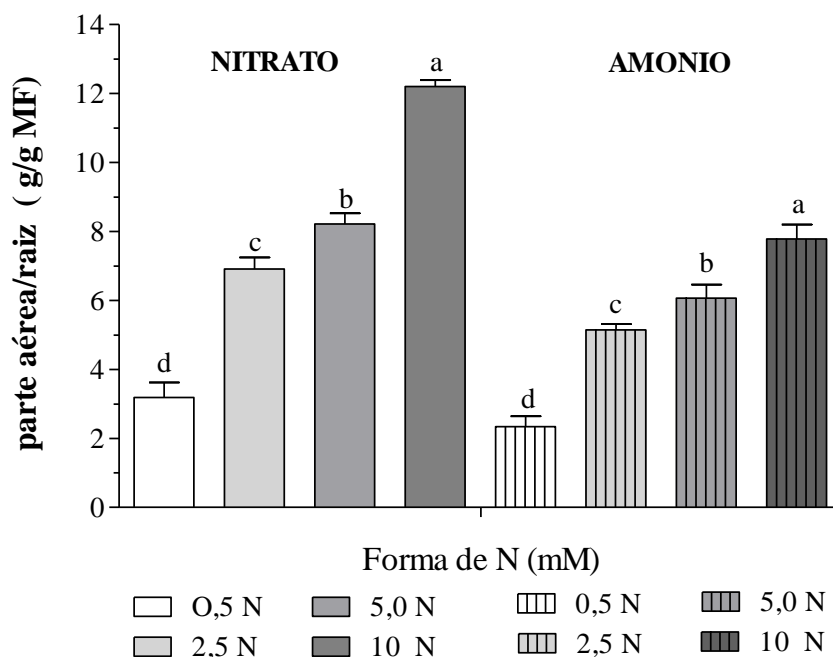
As diferenças visuais, que não foram quantificadas, incluíram diferenças em comprimento e diâmetro, além do padrão de ramificação (número e comprimento de

laterais por eixo nodal) dos respectivos sistemas radiculares, os quais tiveram massas frescas de magnitude não muito diferente (Fig. 12). Anderson et al. (1991) estudaram esse tipo de efeito em raízes de plântulas de milho híbrido, com idade entre 13 e 20 dias pós-germinação. Esses autores verificaram que as plântulas cresceram melhor sob o regime de  $\text{NH}_4^+$  do que de  $\text{NO}_3^-$ . Todavia, com nutrição amoniacal, as raízes laterais apresentaram área seccional transversal 16% maior do que aquelas sob  $\text{NO}_3^-$ , sendo tal engrossamento devido a alterações no córtex radicular. Em relação a este fenômeno, tem sido observado que raízes mais grossas, em particular, raízes laterais de origem nodal, com engrossamento cortical, podem aumentar a resistência radial ao movimento de água e solutos entre a epiderme e o cilindro central, podendo ser parte das perturbações nas relações hídricas induzidas pela nutrição amoniacal, ao menos em espécies sensíveis (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995). Por outro lado, mesmo espécies ou cultivares que possam ser considerados tolerantes, como no caso do arroz, podem apresentar sintomas de toxidez, principalmente quando associados a situações de desbalanceamento iônico e/ou concentrações elevadas de N (BRITTO & KRONZUCKER, 2002; GLASS, 2003).



**Figura 14.** Diferenças visuais observadas no desenvolvimento radicular do capim-Tifton 85 em resposta à nutrição amoniacal, aos 35 dias do período de rebrota. **A:** 0,5 mM; **B:** 10 mM.

Esses resultados influenciaram a relação parte aérea/raiz para todas as doses em ambas as formas de N (Figura 15).



**Figura 15.** Relação parte aérea/raiz, base massa fresca, do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

A relação parte aérea/raiz foi consistentemente maior ( $p < 0,01$ ) com nutrição nítrica do que com nutrição amoniacal ( $7,63 \pm 0,84$  vs.  $5,33 \pm 0,53$  g/g MF, respectivamente), chegando a mais de 56% em favor da forma nítrica, na maior dose. Todavia, dentro de cada forma de N, a relação parte aérea/raiz aumentou significativamente com a dose de N aplicada.

A compreensão dos efeitos das formas de N sobre a alocação preferencial de massa seca entre parte aérea e raízes (relação parte aérea/raiz ou seu inverso) é tema não totalmente elucidado, existindo diversas hipóteses explicativas (ANDREWS et al., 2006). Alguns estudos têm indicado que a nutrição nítrica constitui um sinal que se traduz como um estímulo ao crescimento da parte aérea, com inibição ou repressão correlata do crescimento radicular (BELTRANO et al., 1999; SCHEIBLE et al., 1997; LOPES & ARAUS, 2008; ZHOU et al., 2011), justificando a elevação da relação parte aérea/raiz, dependendo da concentração externa de  $\text{NO}_3^-$ . O possível papel da concentração foliar de  $\text{NO}_3^-$  na determinação desse quociente de partição é abordado no item 4.1.5.4.

Já para o caso da nutrição amoniacal, são citadas possíveis perturbações do  $\text{NH}_4^+$  sobre a fotossíntese ou o pH citoplasmático (LOPES & ARAUS, 2008), a geração de um sinal específico para deficiência ou ausência de nitrato, a partir do metabolismo de N (ANDREWS et al., 2006) ou, no caso das raízes, a competição entre crescimento e assimilação de  $\text{NH}_4^+$  (GIVAN, 1979) ou ainda uma restrição ao crescimento resultante da acidificação da solução externa (BRITTO & KRONZUCKER, 2002; LOPES & ARAUS, 2008).

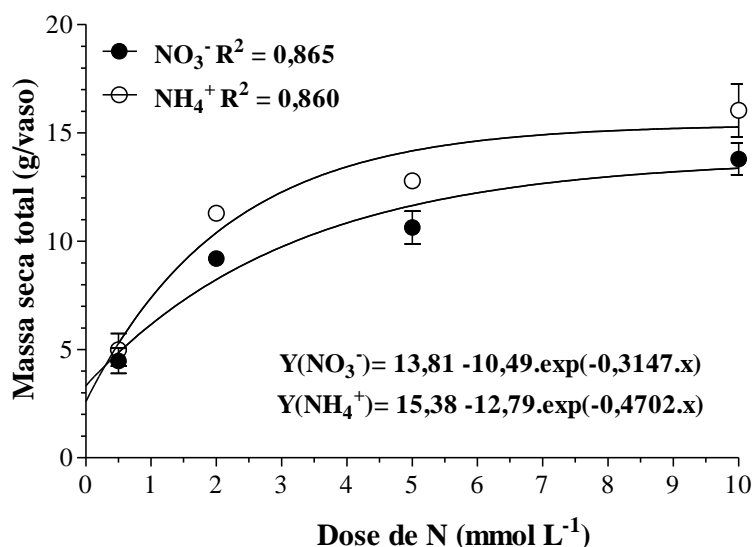
A maioria dessas limitações parece restrita a espécies sensíveis apenas. Espécies forrageiras perenes de clima tropical apresentam padrões de alocação mais ou menos ajustados aos seus ambientes edafoclimáticos. Por exemplo, ao final de um período de crescimento de 14 dias em casa de vegetação, raízes de *Paspalum notatum* acidificaram

a terra aderida a suas raízes (um rizocilindro de 2,0mm de espessura), em média, entre 0,6-0,7 unidades de pH, a partir de um valor basal de 5,87, em resposta à aplicação de 90 mg  $\text{NH}_4^+$  /kg solo (+ Nytrapirin<sup>®</sup>, inibidor de nitrificação), de forma única ou parcelada. Por outro lado, nas plantas que receberam igual quantidade de N sob a forma de  $\text{NO}_3^-$ , as variações de pH rizosférico não excedeu 0,2 unidades. Ao final do período experimental, as plantas sob nutrição amoniacal acumularam 17% mais massa seca e 26% mais N total do que as que receberam  $\text{NO}_3^-$ , apresentando massas radiculares com pesos estatisticamente similares (BENDIX et al., 1982; FERNANDES et al., 1985). Luisi et al. (1983) cultivaram plantas de milho em vasos com solo, tendo sido estudados 15 tratamentos, envolvendo diversas combinações de doses de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ;  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (+ inibidor de nitrificação) e  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Com base em dados da relação raiz/parte aérea, aos 15, 30 e 45 dias; das taxas de crescimento relativo das raízes nesses períodos e dos correspondentes valores de pH do rizocilindro, esses autores concluíram que a acidificação do ambiente radicular do milho (ao menos a níveis moderados) estimula a alocação de carbono às raízes, o que resulta em maiores relações raiz/parte aérea. Em outro experimento de longa duração, Logan et al. (1999) seguiram o curso diário da excreção de  $\text{H}^+$  por raízes de *Brachiaria dictyoneura* e *Brachiaria brizantha* em cultura hidropônica, e sua relação com a absorção de amônio por essas espécies, a partir de uma concentração de 5,0 mM N- $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva. As plantas de *B. dictyoneura* tenderam a ter maior produção de massa seca total que as de *B. brizantha*, como resultado de uma maior produção de raízes. A produção diária de  $\text{H}^+$  aumentou em concordância com os aumentos em matéria seca, sendo maior em *B. dictyoneura*. Da mesma forma, absorção de  $\text{NH}_4^+$  foi sempre maior em *B. dictyoneura* do que em *B. brizantha*, sendo que a primeira excretou mais  $\text{H}^+$  por cada mol de  $\text{NH}_4^+$  absorvido do que a segunda.

Tomados em conjunto, os resultados desses experimentos tem pontos de coincidência com o comportamento do capim Tifton 85 sob nutrição amoniacal, no que se refere à produção de raízes (Fig.12), e possivelmente sirvam como modelo interpretativo das relações parte aérea/ raízes aqui observadas (Fig. 15). É verdade que no presente caso, o pH das soluções era ajustado a cada dois dias, a um valor basal de 5,8 (Material & Métodos, item 3.2.1), e que não foram feitos registros sistemáticos dos volumes de NaOH utilizados para retornar ao pH de referência. Por outro lado, também é certo que períodos de 48 horas são suficientes para gerar uma considerável acidificação na solução nutritiva em decorrência do excesso de absorção amoniacal, tal como observado no estudo de Arruda et al. (1983) com *B. decumbens*.

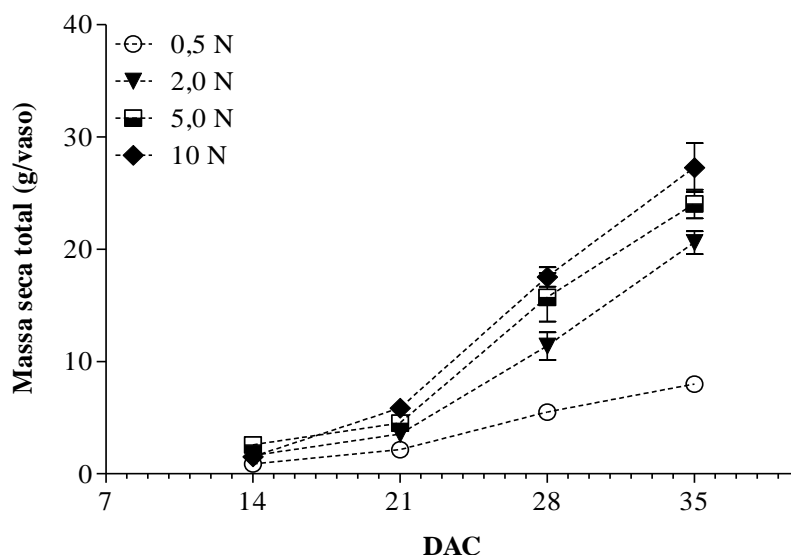
#### 4.1.2 Massa seca

Em relação à massa seca total, houve efeitos significativos para forma de N ( $p=0,0411$ ); dose ( $p<0,0001$ ) e DAC ( $p<0,0001$ ), assim como para as interações forma x dose ( $p=0,0003$ ); forma x DAC ( $p=0,0157$ ) e dose x DAC ( $p<0,0001$ ). Na média geral da massa seca, a produção das plantas cultivadas com amônio foi 9% maior ( $p<0,05$ ) do que as plantas com nitrato (10,0 vs. 9,08 g vaso<sup>-1</sup>, respectivamente). O efeito da interação entre doses e formas de N é apresentado na figura 16.



**Figura 16.** Variação da massa seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

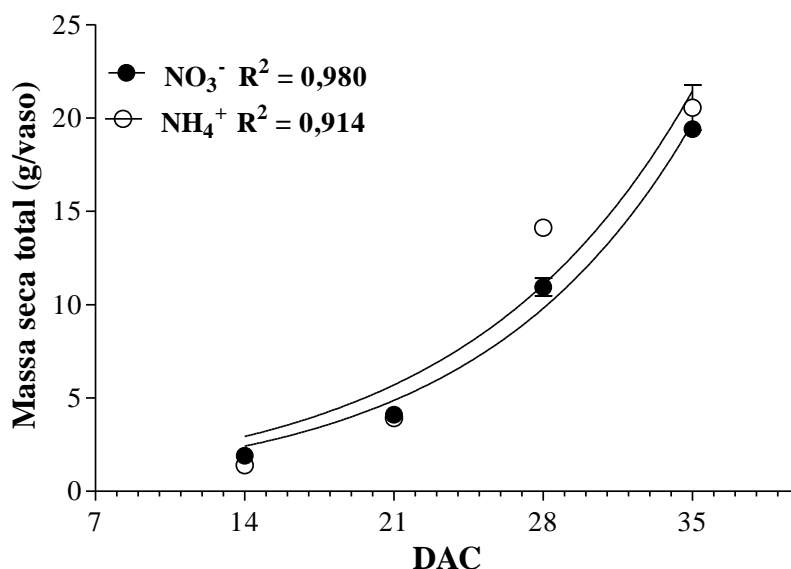
Na figura 17 é possível observar o acúmulo temporal de massa seca produzida pelo Tifton 85, em função das doses aplicadas. Os ritmos diferenciais de acúmulo de massa seca começam a se evidenciar aos 14 DAC, onde a diferença entre a maior e menor dose de N foi de 65% (1,32 vs. 0,82 g/vaso, respectivamente). Essa diferença aumentou consistentemente ao longo das três semanas seguintes de cultivo. Ao final do período experimental, a maior dose teve um acúmulo de massa seca de 225%, em relação à menor dose aplicada.



**Figura 17.** Variação temporal da massa seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão da média de  $n=4$  repetições por tratamento.

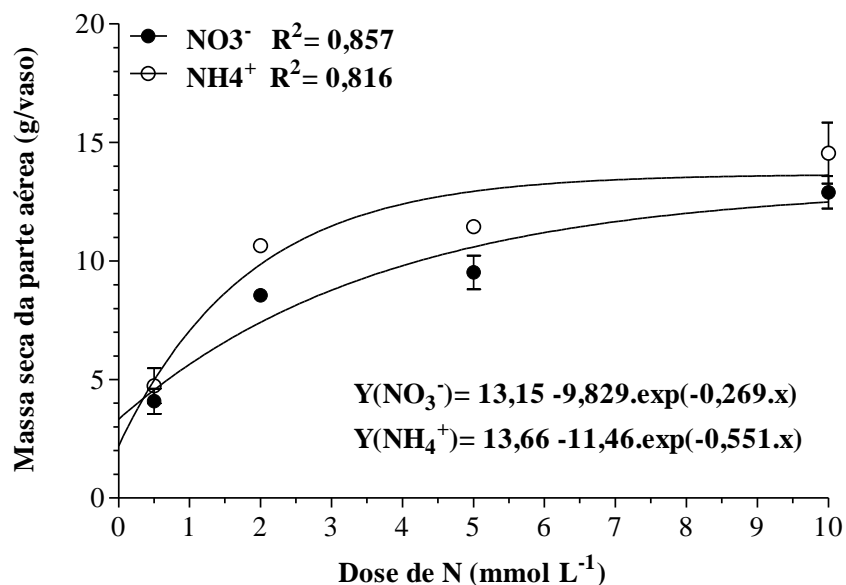
A literatura científica registra respostas produtivas do capim Tifton 85 a doses de N bastante elevadas. Alvin et al. (1999) verificaram que a produção anual de massa seca do Tifton 85 cresceu com as doses de nitrogênio até a aplicação de 600 kg/ha/ano, com intervalo de cortes de quatro semanas, durante a estação chuvosa. Resultados de outros autores também confirmam a elevada resposta produtiva do capim Tifton 85 à adubação nitrogenada (OLIVEIRA et al, 2010; SILVA et al., 2011; QUARESMA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

Na figura 18 é apresentado o desdobramento da interação entre forma de N e DAC. Até os 21 DAC, as produções de ambas as formas são praticamente idênticas. As diferenças evidenciam-se a partir dos 28 DAC, em favor da forma amoniacal, mas a previsão das curvas exponenciais de ajuste indicou uma superioridade menor da forma reduzida, aos 35 DAC (20,55 vs. 19,40 g/vaso, Fig. 18).



**Figura 18.** Variação temporal da massa seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral. Barra vertical indica erro padrão da média de  $n=4$  repetições por tratamento.

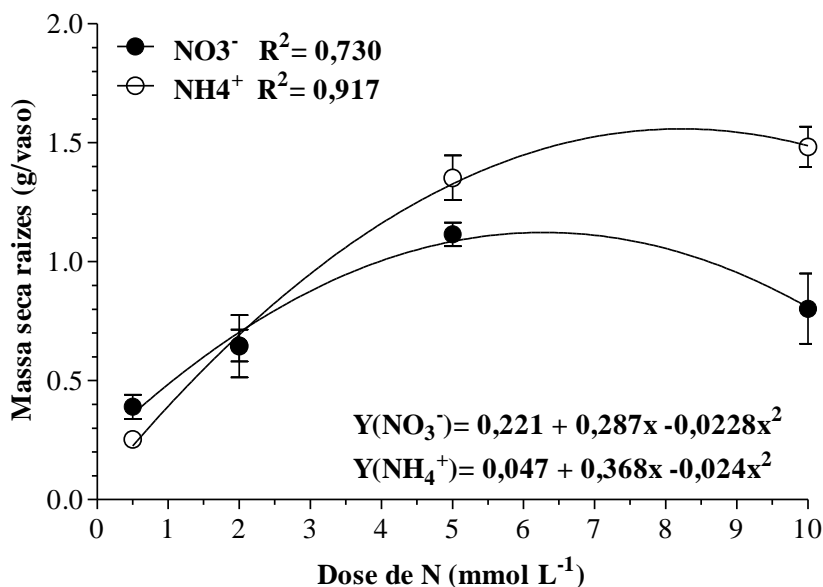
A análise de variância para os valores relativos à massa seca da parte aérea (MSPA, a soma de colmos + bainhas + lâminas foliares) indicou efeitos significativos para doses de N e DAC ( $p<0,0001$ ), assim como para as interações forma de N x dose ( $p=0,0003$ ); forma x DAC ( $p<0,0001$ ) e dose x DAC ( $p=0,0198$ ). Este componente foi afetado apenas marginalmente pela forma de N ( $p=0,072$ ). Na figura 19 são apresentados os dados relativos à produção de MSPA em função das formas e doses de N.



**Figura 19.** Variação da massa seca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=16$  repetições por tratamento.

Essa figura evidencia que apesar de não haver diferenças absolutas entre as formas ( $p>0,05$ ), quando é considerado o efeito das concentrações, surgem dois padrões de resposta estatisticamente diferenciados, justificando a existência de interação significativa forma x dose. A fonte amoniacal evidenciou maior superioridade nas doses intermediárias (2-5mM), do que nas doses extremas (Figura 19), e ficou caracterizada no valor da sua constante  $K=0,551$ , que duplica o valor correspondente à forma nítrica ( $K=0,269$ ).

Ao considerar em conjunto os dados das figuras 18 e 19 é possível inferir que as diferenças observadas em massa seca total estão diretamente relacionadas à dinâmica do acúmulo de massa seca radicular. Em relação a este componente, a análise de variância indicou efeitos significativos para forma ( $p<0,0001$ ) e dose de N ( $p<0,0001$ ); para DAC ( $p<0,0001$ ), assim como para as interações binárias forma x dose ( $p<0,0001$ ) e dose x DAC ( $p=0,0002$ ). No relativo ao efeito das formas e doses de N (Figura 20) os dados mostraram que, com nutrição amoniacal, doses crescentes de N favoreceram mais a partição de carbono para as raízes do que com nutrição nítrica, o que é consistente com as tendências já discutidas na relação parte aérea/raiz, base massa fresca (Figuras 12, 13 e 15).

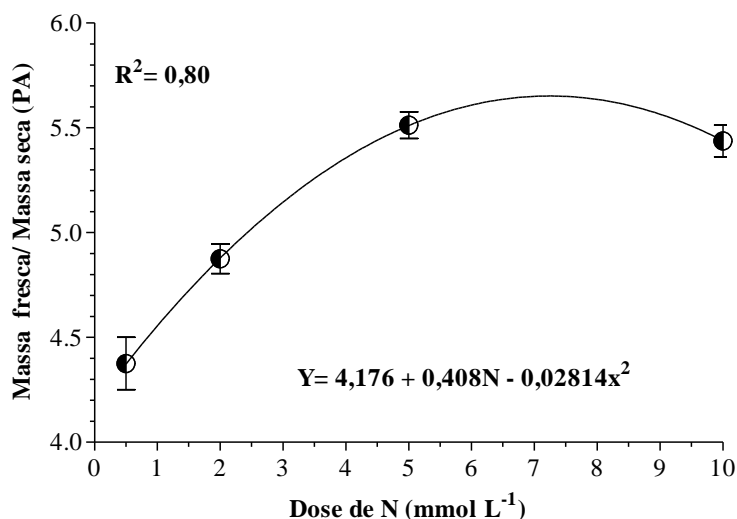


**Figura 20.** Variação da massa seca de raízes do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

#### 4.1.3 Relação massa fresca/massa seca

O grau de suculência, determinado pela relação entre o peso fresco e o peso seco pode representar um importante fator na nutrição animal, já que células com maior conteúdo de água tendem a ser mais palatáveis e digestíveis, além de apresentarem menor proporção de parede celular (MONTOVANI, 1999).

Os valores obtidos para o grau de suculência do capim Tifton 85, afetados pelas doses aplicadas, independentemente da forma de N, são mostrados na figura 21.



**Figura 21.** Variação da relação peso fresco/peso seco da parte aérea, na média das formas de N, em função das doses de N aplicadas. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  valores por tratamento.

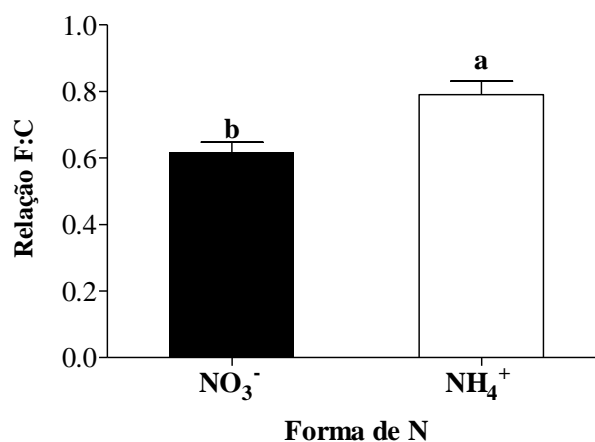


É possível observar que a aplicação de N proporcionou um aumento contínuo da suculência até a dose de 5 mM, quando então se observou saturação desta variável. Especulativamente, pode se pensar que a queda verificada na maior dose de aplicação, reflita o peso da forma amoniacal no valor médio dessa dose. De forma geral, a nutrição nítrica favorece a expressão da suculência (maior relação massa fresca/ massa seca), enquanto com a amoniacal acontece o inverso (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995). Lembrando o discutido anteriormente com relação à possível interferência do amônio na absorção e transporte de água nas plantas (Fig. 14), e dada a importância prática do tema, inclusive em termos do processo de fenação deste capim, seria interessante o desenvolvimento de novas pesquisas sobre esta matéria.

#### 4.1.4 Relação folha colmo (F:C)

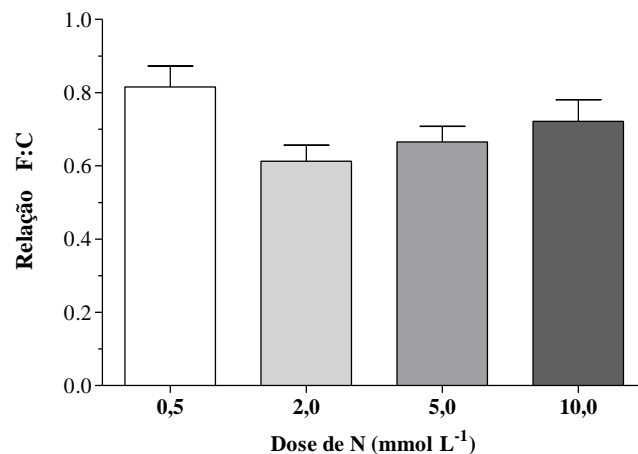
A relação folha:colmo (F:C) é de grande importância para a nutrição animal e para o manejo das plantas forrageiras. Uma alta relação F:C associa-se, de forma geral a forragem de maior teor de proteína e fósforo e menor teor de fibra, afetando, portanto, positivamente, a digestibilidade e o consumo (GOMIDE & QUEIROZ, 1994).

A análise de variância para os dados relativos à relação F:C indicaram efeitos significativos para formas de N ( $p < 0,0001$ ), Dose ( $p = 0,0006$ ) e DAC ( $p < 0,0001$ ), tendo as interações efeitos insignificantes. Em relação às formas de N, as plantas cultivadas com a forma amoniacal apresentaram valores maiores ( $p < 0,05$ ) em relação à forma nítrica:  $0,791 \pm 0,04$  vs.  $0,617$  g F/g C, respectivamente (Fig. 22).



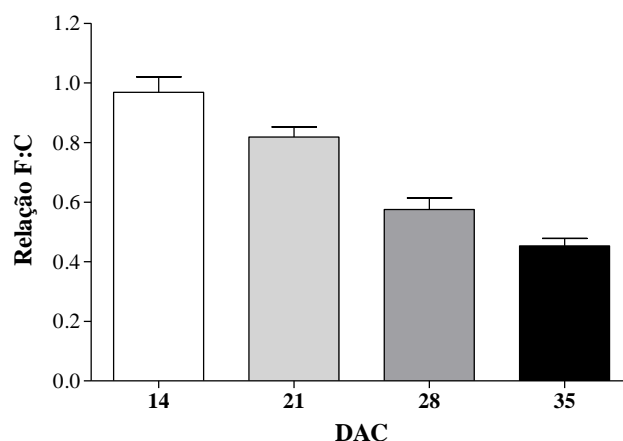
**Figura 22.** Variação da relação folha/colmo (F:C) em plantas de capim Tifton 85 cultivadas sob duas formas de N. Barra vertical indica erro padrão de  $n=64$  valores.

Em relação às doses de N, verificou-se que, com a menor dose aplicada, obteve-se a maior relação F:C do capim (Figura 23). O aumento da disponibilidade de N na solução nutritiva reduziu significativamente a relação F:C, sendo que houve uma certa recuperação na maior dose de aplicação. Do ponto de vista estrutural, não existe uma explicação imediata para este tipo de resposta.



**Figura 23.** Variação da relação folha/colmo em plantas de capim Tifton 85 cultivadas em função da adubação nitrogenada, independentemente de forma de N aplicada e dias de crescimento. Barra vertical indica erro padrão de  $n=32$  valores por tratamento.

O efeito de idade do capim no ciclo de rebrota (DAC) atuou no sentido de reduzir de forma contínua o valor da relação F:C (Figura 24).



**Figura 24.** Variação temporal da relação folha/colmo em plantas de capim Tifton 85, cultivadas em duas formas de N e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=32$  valores por tratamento.

De acordo com Cruz e Boval (2000) essa tendência é bem caracterizada em gramíneas estoloníferas e tem sido documentada previamente em diversos trabalhos. Todavia, a intensidade da redução verificada no sistema de crescimento hidropônico utilizado neste experimento, não foi evidenciada quando este mesmo material foi cultivado em condições de campo. Oliveira (2008), em área experimental adjacente, dentro do campus da UFRRJ, não encontrou efeito de doses de N (0-600 kg N-uréia/ha) para esta relação, a qual teve um valor médio de  $1,10 \pm 0,17$  g/g, durante o período fevereiro-março de 2007.

Os efeitos da toxidez por  $\text{NH}_4^+$  normalmente resultam em redução no crescimento de raízes e da parte aérea das plantas e em menor quantidade de N absorvido (RUAN et al., 2007; HOLZSCHUH et al., 2009). Todavia, considerando-se os resultados até aqui apresentados, cabe concluir que, exceção feita às alterações e/ou possíveis inibições verificadas na morfologia radicular na maior dose aplicada (Fig. 14),

não houve outro efeito negativo da fonte amoniacal sobre o desenvolvimento do capim Tifton 85 até a data de 35DAC. De fato, as plantas cultivadas com a fonte amoniacal tiveram taxas de crescimento totais ou parciais, que resultaram iguais ou superiores aos das plantas que receberam a fonte nítrica, e ao final do ciclo de rebrota estudado, não foram menos produtivas do que estas últimas. Portanto, os dados até aqui discutidos permitem afirmar que o capim Tifton 85 possui um grau de aceitação da nutrição puramente amoniacal, bastante elevado, fenômeno este não documentado previamente.

#### **4.1.5 Absorção e metabolismo do nitrogênio no capim Tifton 85**

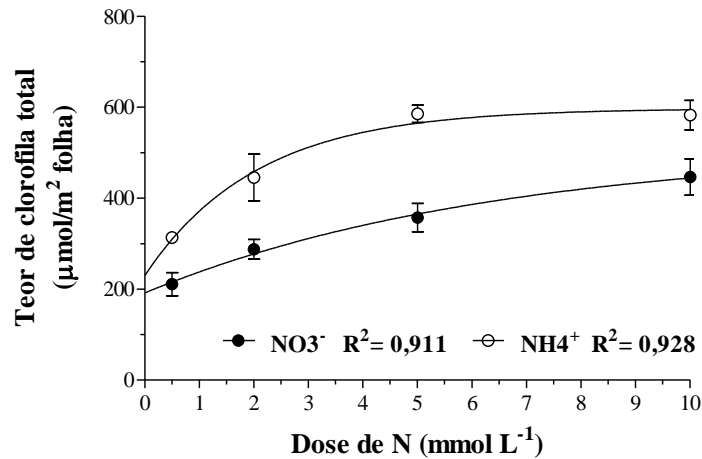
##### **4.1.5.1. Teores de clorofila extraída**

As interrelações dos teores de clorofilas (*a*, *b* e *a+b*) (N<sup>N</sup> Dimetilformamida, MORAN, 1982), as concentrações foliares de N e o acúmulo de massa seca, foram determinadas previamente, no mesmo material que deu origem ao utilizado no presente estudo, em experimento de campo conduzido no campus da UFRRJ (BARBIERI JUNIOR, 2009). Nessa oportunidade foi feita uma comparação entre diversas metodologias constantes na literatura para quantificação de clorofilas. Isto permitiu o estabelecimento de protocolos operacionais, específicos para o capim Tifton 85, tanto para sua determinação por extração direta (BARBIERI et al., 2010), ou de forma indireta, com uso de clorofilômetro (BARBIERI et al., 2012). Todavia, esses protocolos, definidos sob condições de alta irradiância fotossintética prevalecentes nos meses de verão em Seropédica, RJ, não passaram ainda pelo teste sob condições ambientais controladas, em regime de irradiância diferente da condição natural.

O estudo das clorofilas se justifica, uma vez que a quantidade de radiação solar absorvida por uma folha se dá em função, principalmente, da concentração foliar de pigmentos fotossintéticos ativos. Portanto, maiores teores de clorofila podem, em princípio, favorecer diretamente o potencial fotossintético e a produção primária da planta (RICHARDSON et al., 2002).

Para os teores de clorofila total extraída (CFT), a análise estatística indicou existirem efeitos significativos para forma de N, dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações entre forma x dose ( $p = 0,0003$ ), forma x DAC e dose x DAC ( $p < 0,0001$ ).

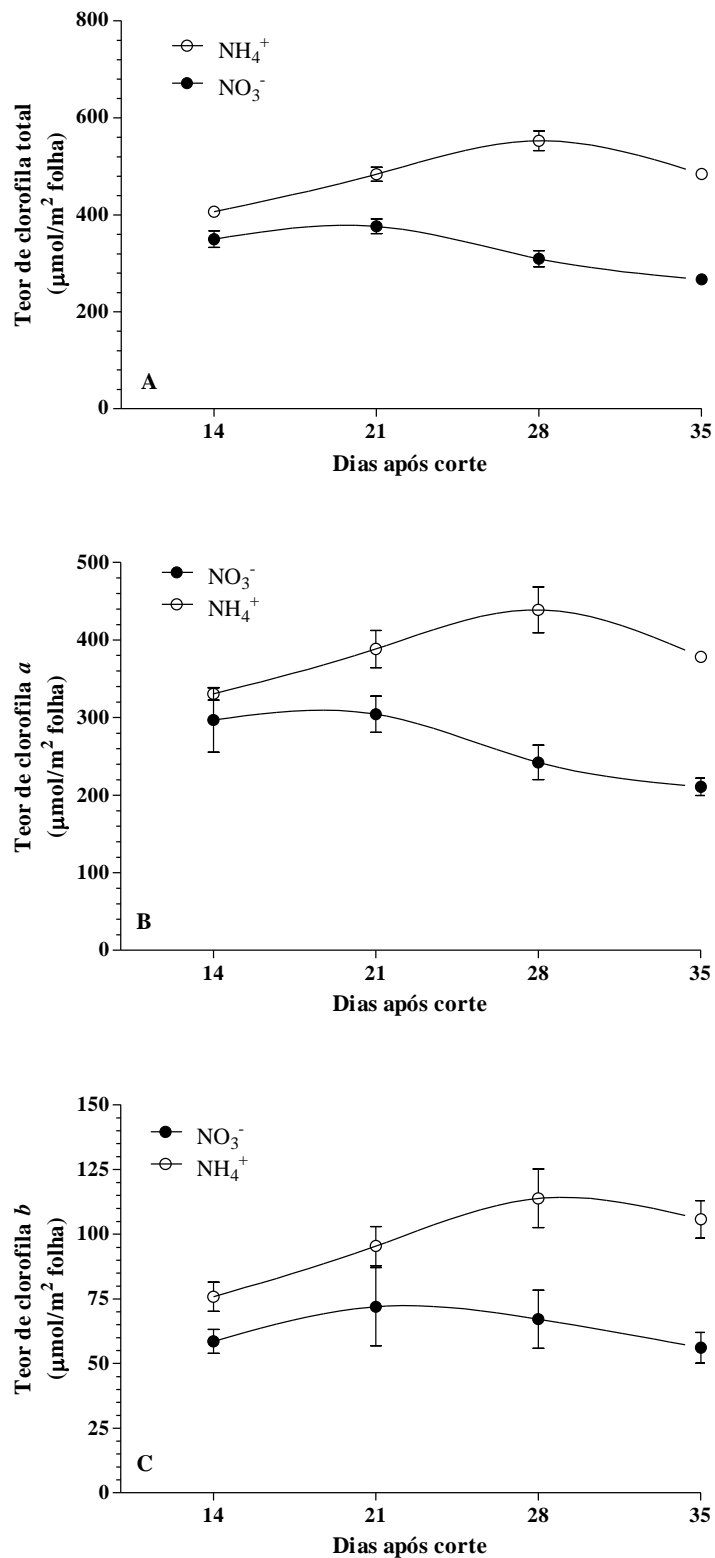
Ao se observar as tendências de variação desenhadas pelo modelo de regressão para a interação forma de N x dose (figura 25), as mesmas fazem lembrar as correspondentes à massa seca total (fig. 16), ou à massa seca da parte aérea (Fig. 19). Também aqui, os valores de clorofila total (CFT), correspondentes à forma amoniacal foram sempre superiores aos da forma nítrica.



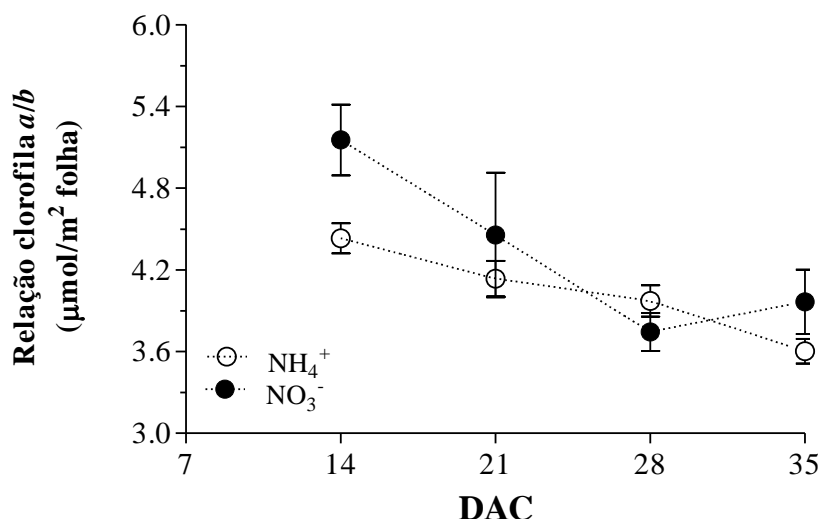
**Figura 25.** Teores de clorofila total, extraídos com DMF, em folhas do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. As equações correspondentes são:  $Y(\text{NO}_3^-) = 512 - 320,4 \cdot \exp(-0,1555 \cdot x)$ ;  $Y(\text{NH}_4^+) = 597,1 - 367,1 \cdot \exp(-0,4857 \cdot x)$ . Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

Ao se seguir o curso temporal das formas de N, pode-se verificar que sob nutrição amoniacal os teores de CFT experimentaram um aumento contínuo até os 28 DAC, enquanto sob nutrição nítrica esses teores começam a declinar, de forma gradativa, já a partir dos 21 DAC (Figura 26A). Dessa forma, as diferenças entre teores foram maximizadas aos 28 DAC, quando o valor médio correspondente aos tratamentos que levaram  $\text{NH}_4^+$  ( $553 \mu\text{mol/m}^2$ ) resultou 78% maior do que o valor correspondente à forma nítrica ( $309 \mu\text{mol/m}^2$ ).

Embora a CFT tenha sido apresentada em primeiro lugar, deve-se lembrar de que a mesma representa a soma das clorofilas *a* e *b*. Por tal razão, as tendências já discutidas na CFT repetem-se para a sua componente principal, a clorofila *a*. Em relação a esta última, todas as fontes de variação primária mostraram significância, pelo teste F ( $p < 0,0001$ ) assim como as interações entre forma x dose ( $p = 0,0003$ ), forma x DAC e dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Os teores associados às plantas sob nutrição amoniacal excederam sempre os correspondentes à nutrição nítrica, com o maior contraste aos 28 DAC (439 vs. 242  $\mu\text{mol/m}^2$ ;  $\text{NH}_4^+$ : + 81%, Figura 26B). A clorofila *b*, também resultou afetada pelas mesmas fontes de variação, acompanhando as tendências da clorofila *a* (Figura 29 C). Como consequência dessas flutuações temporais, a relação clorofila *a*:*b* também serviu para discriminar entre as duas formas, mas as diferenças foram mais notórias aos 14 e 35 dias (Figura 27).



**Figura 26.** Variação temporal dos teores de clorofila extraída de discos foliares, obtidos de folhas do Tifton 85 cultivado com N na forma nítrica e amoniacal, em quatro épocas de amostragem. **A)** Clorofila total; **B)** Clorofila *a*; **C)** Clorofila *b*. As curvas conectando os pontos foram geradas iterativamente pelo procedimento de análise gráfico “*Cubic spline*” (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2003). Barra vertical indica o erro padrão da média.



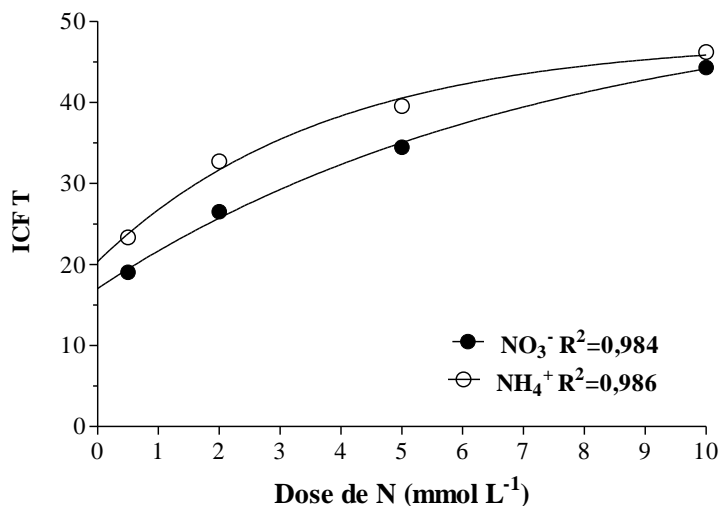
**Figura 27.** Variação temporal da relação entre teor de clorofila *a*:clorofila *b*, em folhas do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em função de forma de N. Barra vertical indica o erro padrão da média.

Neste ponto, é interessante fazer uma comparação com dados obtidos quando o Tifton 85 foi avaliado em condições de campo. Preliminarmente, deve ser considerado que nas duas situações há uma série de diferenças bem marcantes, sendo a principal, do ponto de vista desta análise, o fato de que as fontes emissoras de radiação fotossinteticamente ativas foram diferentes. Se de origem solar, considera-se que um fluxo de radiação global de  $1,0 \text{ MJ m}^{-2}$  equivale a um fluxo fotossintético de  $4,6 \text{ mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (NORMAN & ARKEBAUER, 1991). Levando-se em consideração os fluxos de radiação operantes dentro da câmara de crescimento e a duração do fotoperíodo, os mesmos se equivaleriam a  $9,4 \text{ MJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$  se as fontes emissoras fossem as mesmas. Em condições naturais, os fluxos de radiação, no mês de dezembro de 2008, tiveram média mensal entorno de  $17 \text{ MJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ . Nessas condições, no maior nível de N aplicado ( $150 \text{ kg N-uréia/ha}$ ), o valor de CFT teve um valor médio de  $647 \mu\text{mol m}^{-2}$  (máximo de  $699 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) aos 24 DAC (BARBIERI JUNIOR, 2009). O resultado dessa comparação indica que os teores de CFT registrados dentro do ambiente controlado (Fig. 26A) são representativos e aparentemente não expressam qualquer alteração fisiológica, excluindo o fato de que a redução dos níveis ambientais de luz pode induzir aumentos compensatórios nos teores de clorofila (KULL, 2004). Por outro lado, em condições de campo, verificou-se uma redução progressiva dos valores de CFT, independentemente de dose aplicada, em função do avanço do período de rebrota (BARBIERI JUNIOR, 2009; GOMES et al., 2010; SILVA et al., 2011), fato este também observado no presente experimento, embora de forma mais atenuada (Figura 26 A).

#### 4.1.5.2 Teores de clorofila (via clorofilômetro).

Com relação as determinações de clorofilas feitas com o aparelho ClorofiLOG<sup>®</sup>, e expressas em unidades ICF, os valores para clorofila total (ICF T) foram afetados por efeitos de forma, dose de N e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações simples entre forma x dose, forma x DAC e dose x DAC (Todos  $p < 0,0001$ ). Os dados

correspondentes ao efeito da interação forma x dose são apresentados na figura 28, a qual deve ser comparada à figura 25, relacionada aos mesmos teores de ICF extraídos com DMF, solvente que maximiza a recuperação de clorofila total extraível nesta cultivar (BARBIERI JUNIOR et al., 2010). Dessa comparação, surge que as leituras do clorofilômetro tenderam a minimizar a magnitude das diferenças observadas entre as formas de N, quando determinadas por extração direta.



**Figura 28.** Valores de clorofila total ( $a+b$ ) obtidos por leitura de clorofilômetro, e expressos em unidades relativas (Índice de Clorofila Falker Total, ICF-T), em lâminas foliares do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica o erro padrão da média.

Aparentemente, isso aconteceu por causa de uma subestimativa sistemática dos maiores valores de CFT associados à forma amoniacal, que tendeu a se acentuar no maior nível de N aplicado. Assim, na dose de 10mM, os valores de ICF-T correspondentes às duas formas praticamente igualaram-se, em negação do que revelou a extração direta (Fig. 25 e 28). De acordo com Richardson et al. (2002) este seria um problema geral dos medidores portáteis, no sentido de que conforme aumenta o teor de clorofila nas folhas as suas estimativas vão perdendo sensibilidade. Segundo este autor, uma explanação possível é que a distribuição das moléculas de clorofila em folhas com alto teor é muito menos uniforme que em folhas com baixo teor, o que da origem ao chamado “efeito peneira”. Outra causa possível radicaria em um efeito de saturação de resposta induzida pela alta concentração de clorofilas, as quais absorveriam praticamente toda a luz emitida pelo diodo em  $\lambda = 660$  nm, transmitindo muito pouco dessa radiação até o lado oposto. Esse tipo de restrição, todavia, em nada tira o mérito operacional do aparelho, o qual, trabalhando dentro de faixas não excessivamente elevadas de adubação nitrogenada, tem mostrado excelente capacidade preditiva dos teores de N foliar e de massa de forragem em Tifton 85 (SILVA et al., 2011; BARBIERI JUNIOR et al., 2012).

A partir da discussão anterior, e aceitando-se os teores de CFT obtidos por extração direta como uma aproximação mais correta do comportamento do capim em termos de produção de clorofilas (Fig. 25 e 26), cabem algumas considerações importantes em relação à presente pesquisa. A primeira é a constatação de que a nutrição amoniacal favoreceu um aumento do teor de clorofila foliar total em concordância com o aumento da concentração externa de N (Figura 25). Isto foi

associado a uma redução da relação clorofila *a*: clorofila *b*, o que pode ser visto como um traço de eficiência, já que a clorofila *b* é um pigmento que não está diretamente ligado à captura e transdução de luz para a fotossíntese, mas à ampliação da faixa de luz utilizada na fotossíntese (Figura 27). Experimentos de campo, onde as parcelas de Tifton 85 receberam adubação nitrogenada a partir de uréia ou sulfato de amônio, permitiram o estabelecimento de relações positivas, altamente significativas, entre as concentrações foliares de clorofilas e as produções de biomassa seca total da parte aérea ou de lâminas foliares (BARBIERI JUNIOR, 2009; GOMES et al., 2010; SILVA et al., 2011). Esses resultados, então, conduziram à conclusão de que quanto maior o teor de clorofilas nas folhas, maior seria a produção esperada de biomassa. Todavia, pode acontecer que tal fenômeno não esteja operando no presente experimento, desde que os teores de clorofila nas folhas das plantas sob nutrição amoniacal, tenham alcançado níveis saturantes, em excesso aos requeridos para a máxima taxa fotossintética possível, como foi mencionado previamente. Mesmo assim, permanece o fato de que, com amônio, as plantas produziram, em média, 28% mais massa foliar por unidade de colmo do que aquelas que receberam nitrato como fonte de N (Figura 22). Então, mesmo supondo igualdade entre as taxas de assimilação fotossintética com ambas as formas de N, tal como verificado em arroz (ZHOU et al., 2011), as plantas sob nutrição amoniacal deveriam ter maior produção de fotossintetizados, pelo fato de terem maior massa foliar (RUAN et al., 2007).

Praticamente todas as revisões de literatura sobre a matéria mencionam o fato da nutrição amoniacal ser uma opção energeticamente mais econômica para as plantas do que a nítrica, em função dos níveis de oxiredução de cada um desses íons. Por outro lado, como é preciso uma considerável quantidade de esqueletos de carbono na forma de cetoácidos para a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  (BRITTO & KRONZUCKER, 2002), é necessário que as plantas tenham uma alta capacidade para gerar e alocar os fluxos de carboidratos solúveis necessários para a neutralização dos níveis, potencialmente tóxicos, de amônio nos diversos tecidos (RUAN et al., 2007). Conquanto este último aspecto seja uma condição necessária, não é suficiente: como Garrido (2007) lembrou, não basta as plantas apresentarem altos teores de açúcares para a perfeita assimilação do N. Sobretudo, é necessário apresentarem elevada atividade das vias bioquímicas que levam do açúcar ao cetoácido.

#### **4.1.5.3 Nitrogênio total**

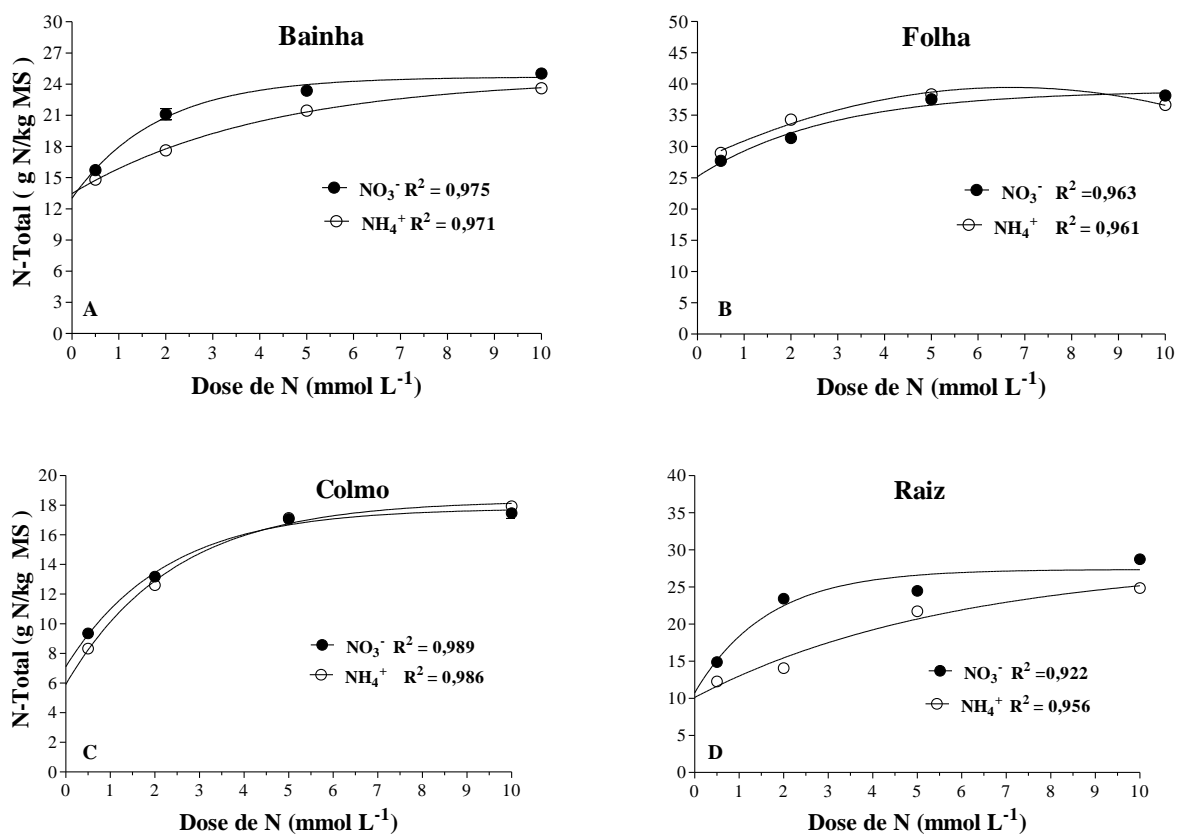
Os dados relativos aos teores de N total presentes nos componentes morfológicos estudados, são apresentados nas Figuras 29 e 30.

Em relação à bainha, a análise de variância indicou efeitos significativos para forma, dose de N e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para interações simples forma x dose ( $p = 0,039$ ; figura 29A); dose x DAC ( $p < 0,0001$ ) e forma x DAC ( $p < 0,0001$ , figura 30A).

Em relação às lâminas foliares, as sua variabilidade experimental foi devida aos efeitos de dose de N ( $p < 0,0001$ ); forma de N ( $p = 0,0006$ ) e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como às interações simples forma x dose ( $p = 0,0419$ , figura 29B); dose x DAC ( $p < 0,0001$ ) e forma x DAC ( $p = 0,0174$ ; figura 30B).

Para o componente colmo, o teste F indicou efeitos significativos para dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações simples forma x dose ( $p = 0,0301$ , Fig. 29C), forma x DAC ( $p < 0,0001$ , Fig. 30C) e dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Finalmente, para as raízes, houve efeitos significativos de forma e dose de N ( $p < 0,0001$ ) e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações forma x dose ( $p = 0,0393$ , Fig. 29D) e forma x DAC ( $p < 0,0001$ , Fig. 30D).





**Figura 29.** Teores de nitrogênio total no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. A) Bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

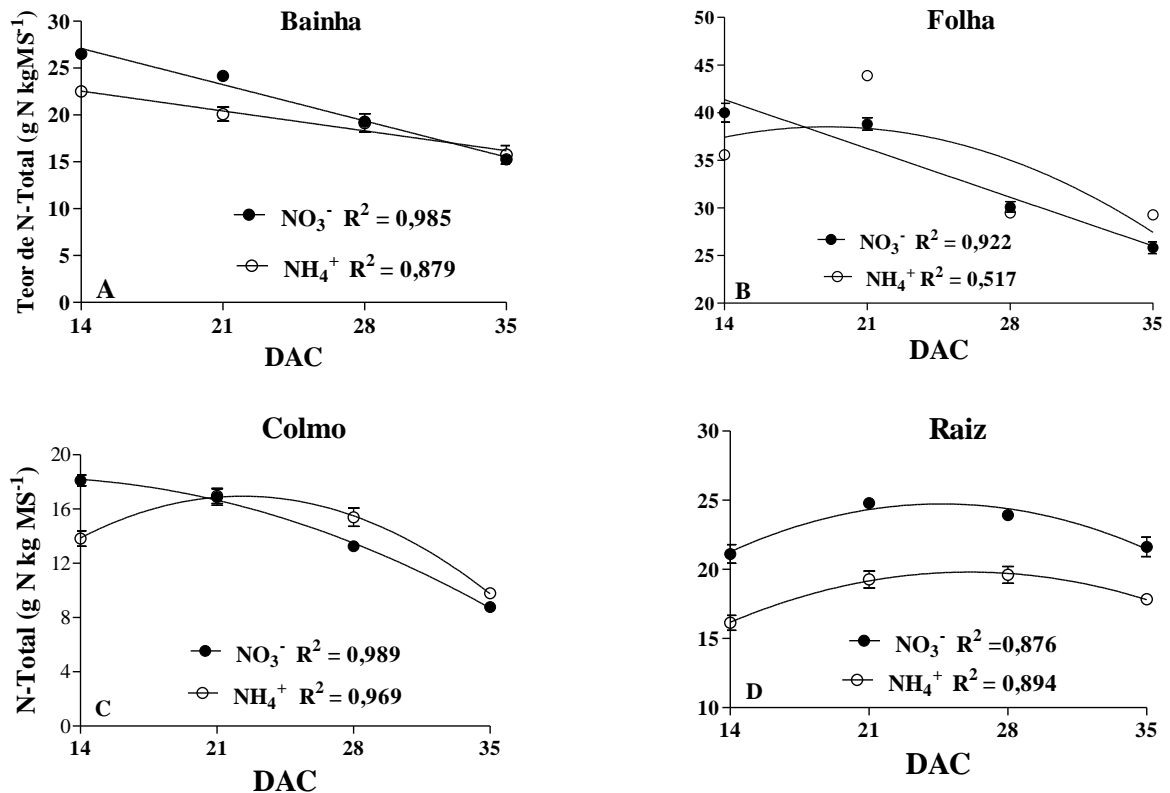
Ao se fazer uma apreciação desses resultados, alguns aspectos merecem destaque. Em primeiro lugar, o fato de que as tendências de resposta ao fator concentração externa de N, nas quatro partes vegetativas do capim, seguiram estreitamente as observadas em relação à massa seca total ou à massa seca da parte aérea (Fig. 16 e 19). De fato, todas as curvas apresentadas na figura 29 foram geradas com o mesmo tipo de modelo exponencial utilizado nos ajustes da massa seca, exceto o teor de N total foliar, sob nutrição amoniacal, que respondeu conforme um modelo polinomial quadrático (Fig. 29B). Relacionando-se os valores médios dos teores de N contidos em colmos ou folhas, com os seus correspondentes dados de biomassa, total ou da parte aérea, obtêm-se os coeficientes de correlação mostrados na Tabela 5, que ilustram a estreita covariação entre biomassa e teor de N total, sugerindo a operação de mecanismos que regulam a inter-relação entre os metabolismos de C e N e controlam os influxos radiculares de N mineral (PITMAN, 1972; INSANDE & TOURAINE, 1994; SCHEIBLE et al., 1997; FOYER et al., 2003).

**Tabela 5.** Coeficientes de correlação simples entre os teores de N total em folhas e colmos do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, com duas formas de N mineral, e os valores da massa seca total (MST, raiz + p. aérea) ou da massa seca da parte aérea (MSPA).

Teor de N (mg/kg)	MST		MSPA		
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
<b>Colmo</b>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,948 (p=0,052)	-----	0,930 (p=0,070)	-----
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-----	0,955 (p=0,045)	-----	0,938 (p=0,0610)
<b>Folha</b>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,927 (p=0,073)	-----	0,908 (p=0,092)	-----
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-----	0,896 (p=0,104)	-----	0,882 (p=0,118)

Sabe-se que a planta usa informações emanadas do seu “status” de C e N para regular a expressão gênica e a atividade enzimática (MILLER & CRAMER, 2004; MILLER et al., 2007). A compreensão da natureza dos sinais das formas de N para os diversos sistemas metabólicos tem aumentado bastante nos últimos anos (FOYER & ZHANG, 2011; XU et al., 2012; MOKHELE et al., 2012). Não obstante isso, muitos aspectos ainda precisam de estudos mais detalhados, principalmente no que diz respeito ao compartimento radicular. No presente estudo, os maiores contrastes entre formas e doses de N, em relação aos teores de N total, associaram-se ao compartimento radicular, especialmente a níveis intermediários de aplicação (Figura 29 D). Todavia, a maior parte do N incorporado foi alocada às folhas, independentemente de formas de N (Figura 29 B). Portanto, excetuando-se as raízes, que mostraram um padrão mais particularizado, nos outros três compartimentos verificou-se um mesmo padrão, rigidamente caracterizado, iniciado com uma fase linear de resposta entre 0,5 e 5 mM, mais acentuado no colmo e menos nas folhas, seguida de uma fase de estabilização dos teores entre 5,0 e 10,0 mM.

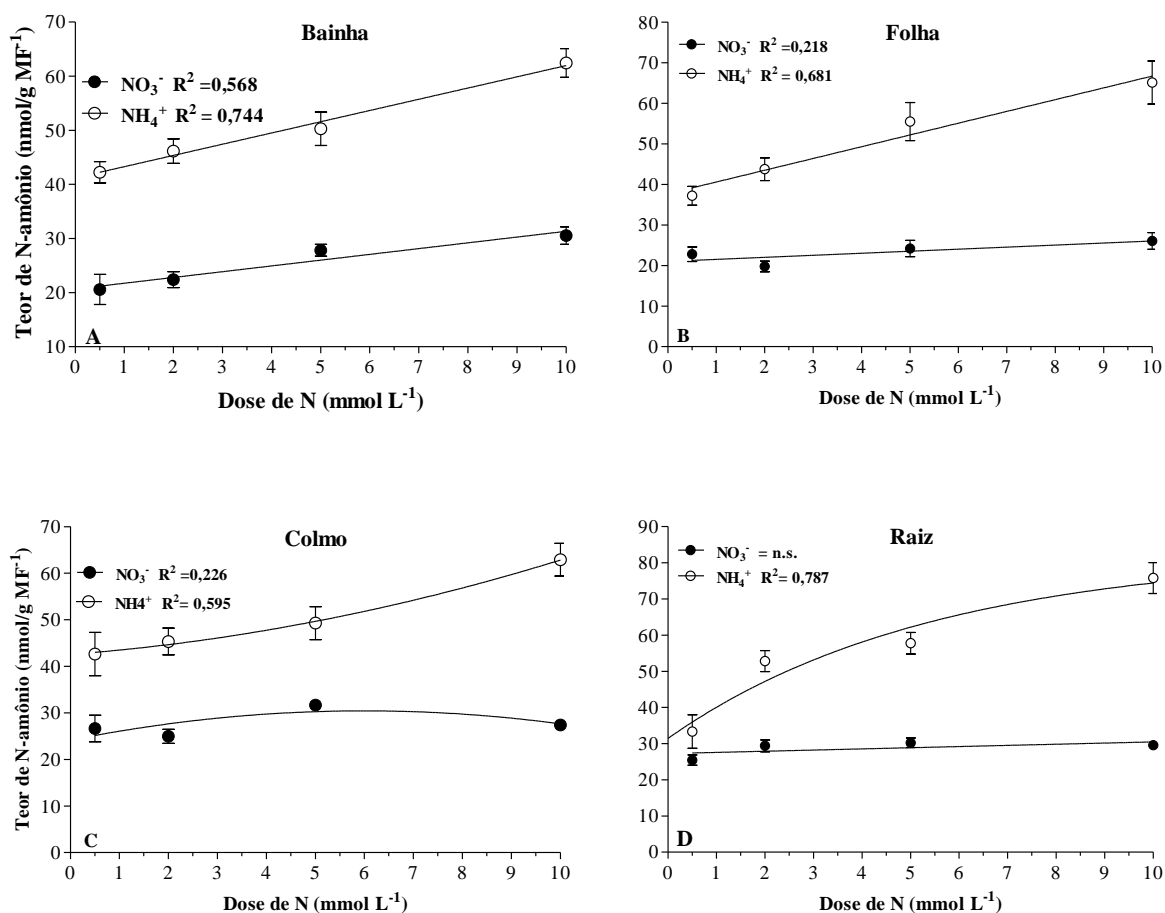
Na figura 30 são apresentados os teores de N total em função de formas e DAC. A redução temporal dos teores de N é fato bem descrito na literatura sobre nutrição nitrogenada em pastagens de *Cynodon* (ADESE, 2004; OLIVEIRA, 2008). Vários fatores podem estar envolvidos para justificar esse efeito de diluição. A pesquisa tem mostrado que tanto os influxos radiculares de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quanto de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sofrem regulação tipo “feedback” pelos produtos gerados pelo seu próprio metabolismo, sendo bem caracterizado o papel repressor dos “pools” internos de glutamato e glutamina nesse respeito (VIDMAR et al., 2000; BRITTO & KRONZUCKER, 2005; MILLER et al., 2007). Outros estudos tem sustentado que, ao menos no caso do NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, são os seus próprios teores intracelulares que estariam no controle dos fluxos radiculares líquidos do anion (FOYER et al., 2003).



**Figura 30.** Variação temporal dos teores de nitrogênio total do capim Tifton 85 cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral. A) Bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raízes. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

#### 4.1.5.4 N-solúvel: teores de N-amônio, N-nitrato, N-amino livre e atividade da nitrato redutase

Em relação aos teores de N-amônio da bainha (Figura 31 A), a análise de variância indicou efeitos significativos para forma de N, dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações forma de N x DAC ( $p < 0,0001$ ) e dose x DAC ( $p = 0,0029$ ). Para os teores de amônio na lâmina foliar (Figura 31B), houve efeitos significativos para forma de N, dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações simples de forma de N x dose ( $p = 0,0029$ ) e forma x DAC ( $p < 0,0001$ ). Nos colmos (Figura 31 C), os valores de amônio foram significativos (Teste F) para forma de N ( $p < 0,0001$ ); dose ( $p = 0,0059$ ) e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações forma de N x dose ( $p = 0,0164$ ) e forma x DAC ( $p < 0,0001$ ). Finalmente, para os teores de N-amônio nas raízes, os valores de F foram significativos para forma de N, dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações simples forma de N x dose e forma x DAC ( $p < 0,0001$ ) (Figura 31D).



**Figura 31.** Teores de N-amônio no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

Dentro dos quatro compartimentos morfológicos estudados, e independentemente de forma de N, os teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se mantiveram sempre dentro de uma faixa de variação sub-micromolar (20-70 nmol/g MF), ou seja, muito baixos, se comparados aos verificados em outras espécies. Em plantas de arroz cultivadas em solução nutritiva de Hoagland, contendo 14,3 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a pH 5,5, Santos et al. (2009) observaram teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 1,46; 1,41; e 3,85  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF em raízes, colmos, e folhas, respectivamente. Na sua revisão, Miller & Cramer (2004) mencionam trabalhos que relatam a ocorrência de concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, qualificadas como “relativamente baixas”, da ordem de 0,4 e 2,6 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, no xilema de plantas de trigo e milho, respectivamente, quando supridas externamente com 4 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Schjoerring et al. (2002) determinaram, no xilema de *Brassica napus*, concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> <1 mM, quando as plantas receberam entre 3-10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e entre 1-5 mM com suprimento externo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na faixa de 3-10 mM. Em outro exemplo, plantas de sorgo após 10 dias de permanência em solução nutritiva de Hoagland a 0,25 FI e pH 6,0, contendo de 5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; mostraram níveis de 2,5  $\mu\text{M}$  NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> MS nos colmos, e apenas 7% dessa concentração, nas folhas (LOBO et al., 2011). Em todos esses exemplos, as concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> registradas excedem, em várias ordens de magnitude, as verificadas no presente experimento.

No caso das plantas cultivadas com nutrição amoniacal, há um ritmo de aumento linear ou quase linear, no caso da parte aérea (Figura 31 A-C), ou curvilíneo no caso das raízes (Figura 31 D), o que deve expressar o aumento do influxo passivo de  $\text{NH}_4^+$  em decorrência do aumento da concentração externa de N. Já no caso das bainhas e folhas, os pequenos teores de  $\text{NH}_4^+$  que aparecem, podem ser produto das atividades metabólicas normais, as quais envolvem rotineiramente “*turn-over*” ou outros tipos de processamento de proteínas, ou diversas outras interconversões metabólicas geradoras de  $\text{NH}_4^+$  (LEA & MIFLIN, 2011). Por se tratar de uma representante do gênero *Cynodon*, esta cultivar possui um metabolismo  $\text{C}_4$  subtipo NAD-ME (enzima málica), que possui um fluxo fotorrespiratório muito lento (CARMO-SILVA et al., 2008), que elimina essa possibilidade como contribuinte ao aparecimento de  $\text{NH}_4^+$  livre nas células dos tecidos foliares. No caso da nutrição nítrica, chama a atenção, em todos os componentes morfológicos, a quase ausência de variação nos teores de  $\text{NH}_4^+$ , que neste caso terão tido a sua origem no processo de redução de nitrato catalisado pela nitrato-redutase.

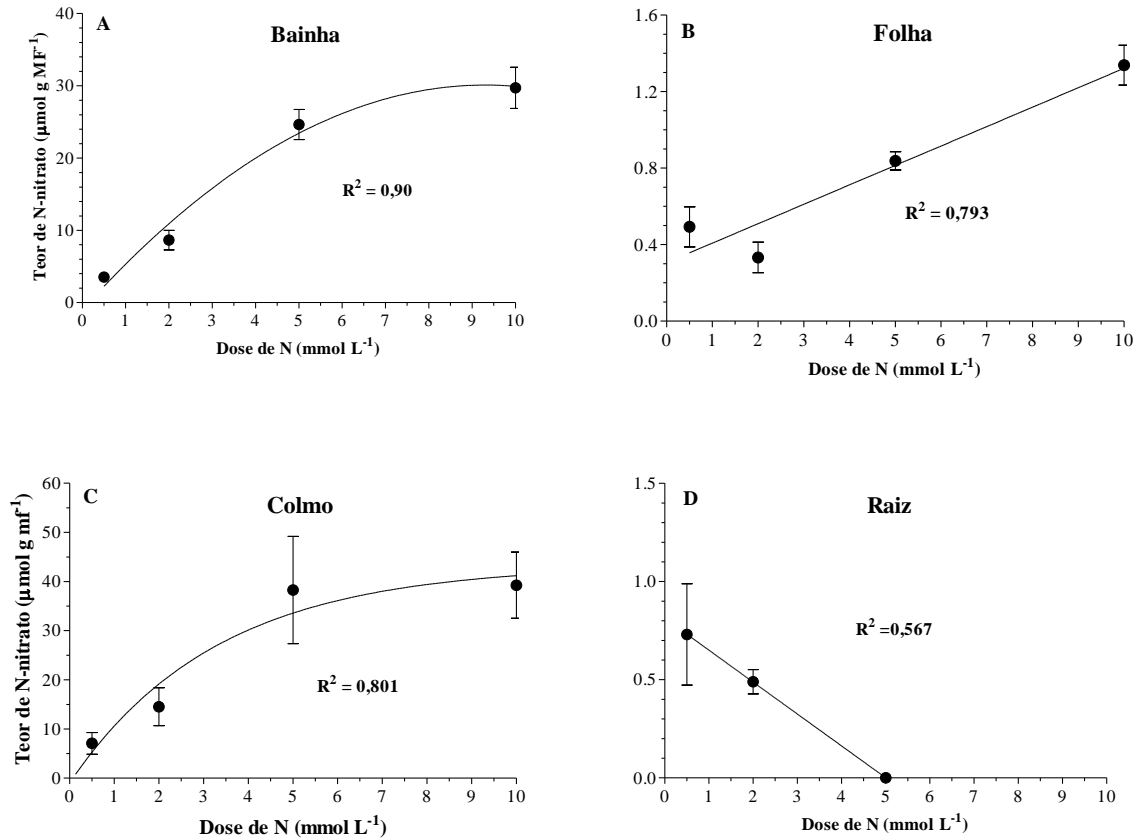
Os testes para detecção de nitrato, nos vasos que receberam nutrição amoniacal, deram resultados negativos ou no melhor dos casos, traços do composto, para todas as partes das plantas. Dessa forma, e para efeitos de processamento estatístico, em todos os casos foi atribuído o valor zero para os teores de N-nitrato sob nutrição amoniacal.

Em relação aos teores de N-nitrato na bainha, o teste F indicou significância para as fontes de variação primárias: forma de N, dose e DAC (todas a  $p < 0,0001$ ); assim como para as interações forma de N x dose ( $p < 0,0001$ , Figura 32A), forma x DAC ( $p < 0,0001$ ) e dose x DAC ( $p = 0,0002$ ). Para a lâmina foliar, o teste F indicou efeitos significativos para forma de N ( $p < 0,0001$ ) e para a interação dose x DAC ( $p = 0,0117$ ). Para colmo, houve significância para forma, dose e DAC (todas a  $p < 0,0001$ ), assim como para as interações simples forma de N x dose, para forma x DAC ( $p < 0,0001$ ) e para dose x DAC ( $p = 0,0009$ ). Nas raízes, houve efeitos significativos para forma ( $p = 0,0011$ ) e dose ( $p = 0,0082$ ), assim como para a interação forma de N x dose ( $p = 0,0082$ ). (Figura 32 D).

Para efeitos de discussão dos dados relativos aos teores de nitrato, é mais interessante principiar pelo componente radicular. Como pode ser visto na figura 32D, os teores de nitrato declinaram abruptamente a partir de 0,5 mM de  $\text{NO}_3^-$  e atingiram valor nulo 5,0 mM de  $\text{NO}_3^-$  aplicado. Isto significa uma situação de “depleção” absoluta de nitrato nas raízes quando aplicadas concentrações externas  $> 5,0$  mM. Levando-se em consideração que a atividade da enzima nitrato-redutase (ANR) é induzida pelo seu próprio substrato (FERNANDES & FREIRE, 1976), e que a mesma se manteve muito alta nas raízes, respondendo linearmente até a maior dose de  $\text{NO}_3^-$  aplicada (Figura 34D), então a redução assimilatória do nitrato poderia justificar parte importante da “depleção” de N- $\text{NO}_3^-$  nas raízes do capim. Por outro lado, segundo Glass (2003), conforme aumentam as concentrações externas de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , aumentam também, de forma correlata, às taxas de efluxo radicular dessas formas de N. Portanto, um incremento da taxa de efluxo de  $\text{NO}_3^-$  nas maiores doses aplicadas também poderia ter contribuído para o resultado observado. Finalmente uma outra fração foi transportada via xilema, passando a se acumular no colmo (Figura 32 C) e nas bainhas foliares (Figura 32 B), de forma dependente da concentração externa. Estes compartimentos, em conjunto, podem funcionar como regiões de acúmulo temporário e de controle dos influxos de N às lâminas foliares em expansão. Por exemplo, Fernandes et al. (1985), evidenciaram o papel dos rizomas como uma zona tampão no que diz respeito ao N solúvel em trânsito entre raízes e folhas de *Paspalum notatum*. Da mesma forma, em cana-de-açúcar, colmos e bainhas foliares parecem funcionar com regiões de acúmulo

de N-solúvel (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995), assim como no capim colonião (SILVEIRA & SANT'ANNA, 1988). Em sorgo, verificou-se que o colmo é um órgão de reserva importante para acumulação de nitrato no tecido e sua posterior utilização nas folhas (LOBO et al., 2011). No presente caso, os dados sugerem que as bainhas regulam os fluxos de forma a manter baixas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas (Figura 32 A), onde ficaria confinado principalmente no *pool* “vacuolar”, de forma a manter também baixas taxas de atividade da nitrato-reductase nas lâminas foliares (Figura 34 B), reduzindo assim a competição por energia e poder redutor com a assimilação de carbono nos cloroplastos. Essa seria a estratégia esperável numa planta que, aparentemente, faz das raízes o compartimento morfológico principal para a assimilação tanto de amônio quanto de nitrato. Por outro lado, os presentes dados confirmam que o gênero *Cynodon* spp. comporta espécies ou cultivares com baixo potencial de acumulação de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas (HOJJATI et al., 1972).

Como mencionado previamente, a importância do  $\text{NO}_3^-$  na vida das plantas, vai muito além de seu papel como um macronutriente. As plantas utilizam o nitrato como um sinalizador molecular que controla muitos aspectos do metabolismo e desenvolvimento, com envolvimento em transcrição gênica, acúmulo de proteínas, ativação de quinases, germinação, arquitetura radicular, osmorregulação e movimentos estomáticos (ANDREWS et al., 2006; WILKINSON et al., 2007; LOPES & ARAUS, 2008; PELLNY et al., 2008). Nesse contexto, tem sido sugerido que  $\text{NO}_3^-$  atua como um sinal para regular a partição de matéria seca entre parte aérea e raízes, embora Andrews et al. (2006) sustentem que tal partição seria regulada, em última análise, pelas concentrações de proteína solúvel na parte aérea. No presente caso, regressões entre a relação parte aérea:raiz sob nutrição nítrica (Figura 15) e os teores de  $\text{NO}_3^-$  em folhas, colmos e bainhas, resultaram em coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de 0,573; 0,795 e 0,773, respectivamente. Isto reforça a impressão de que os componentes colmos e bainhas podem ter algum tipo de participação na regulação ou alocação dos fluxos de carbono e nitrogênio entre parte aérea e raízes.



**Figura 32.** Teores de N-nitrato no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a quatro doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mineral A) Bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de n=4 repetições por tratamento.

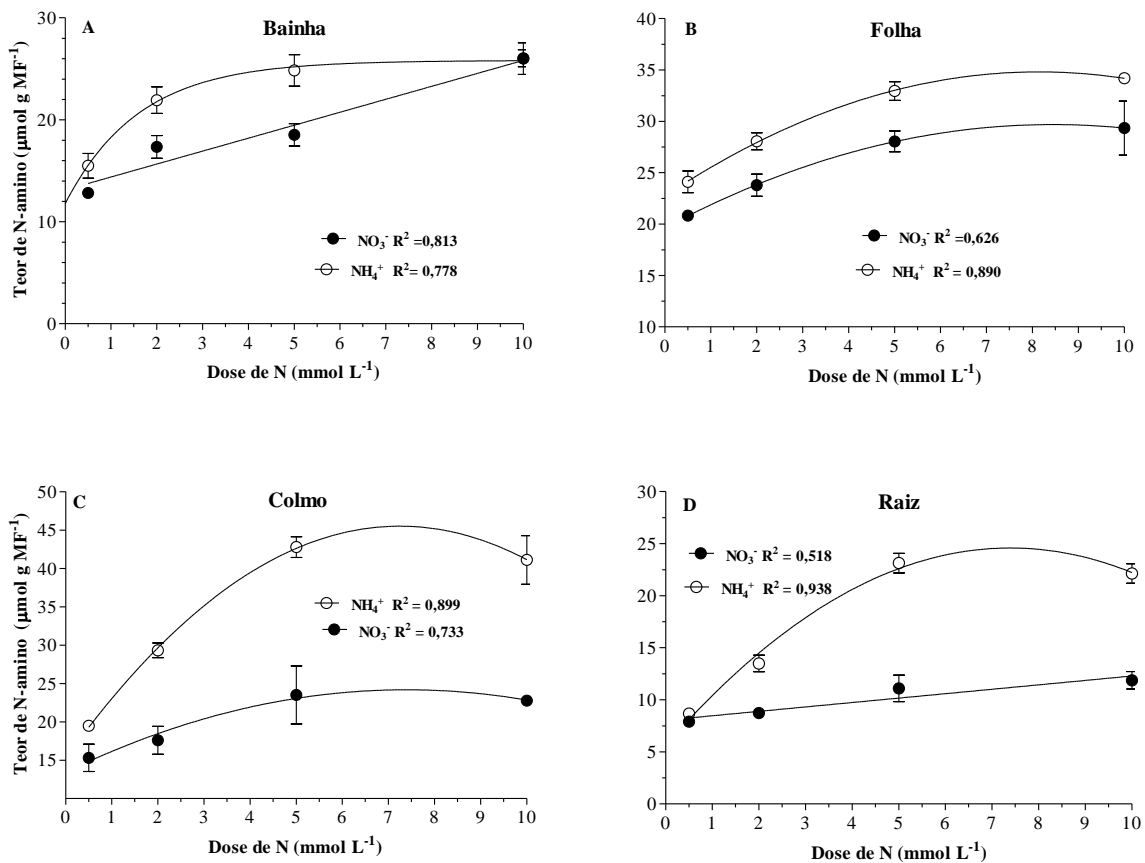
Em relação aos teores de N-amino da bainha, a análise de variância indicou efeitos significativos para forma de N, dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações forma de N x dose ( $p = 0,0461$ ) e dose x DAC ( $p = 0,0095$ ). Para os teores de N-amino na lâmina foliar, o teste F indicou efeitos significativos para forma de N, dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para a interação simples forma de N x DAC ( $p < 0,0001$ ).

Nos colmos, os teores de N-amino resultaram afetados pela forma e dose de N ( $p < 0,0001$ ) e pelo DAC ( $p = 0,0353$ ), assim como pelas interações forma de N x dose ( $p = 0,0003$ ) e dose x DAC ( $p = 0,0004$ ). Nas raízes, houve significação para forma, dose e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para as interações forma de N x dose ( $p < 0,0001$ ), forma x DAC ( $p = 0,0013$ ) e dose x DAC ( $p < 0,0001$ ).

Fazendo-se uma apreciação geral dos resultados, pode ser destacado, inicialmente, um efeito muito consistente da nutrição amoniacal nos diversos componentes morfológicos, induzindo teores de N-amino significativamente maiores do que aqueles sob nutrição nítrica, principalmente em raízes e colmos. Esse tipo de resposta é característico em plantas supridas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000; FERNANDES & ROSSIELLO, 1986).

Como aconteceu com a maioria dos outros indicadores, o maior contraste entre formas e doses encontra-se nas raízes (Figura 33 D). Nesses órgãos, o crescimento e o processo de assimilação de nitrato competem pela energia disponível (RADIN et al., 1978). Isto porque a assimilação de nitrato requer energia e esqueletos de carbono que

são fornecidos pela oxidação dos carboidratos translocados da parte aérea. Dessa forma, com o aumento do influxo de nitrato a partir das doses aplicadas, houve intensa estimulação da atividade da nitrato redutase (Figura 34 D), especialmente entre os 14-21 DAC (Figura 35 D), e intensa utilização de esqueletos de carbono para síntese de aminoácidos, tal como evidenciam os baixos níveis de açúcares solúveis detectados nessas raízes ( $>10 \mu\text{mol g MF}^{-1}$ , Figura 36 D). A intensidade da competição está bem evidenciada na figura 20, que mostra as diferenças em crescimento de massas radiculares entre ambas as formas. Os dados também são indicativos de que a bainha comportou-se como um acumulador linear do N-amino exportado das raízes, sem evidenciar qualquer tendência à saturação (Figura 33 A).



**Figura 33.** Teores de N-  $\alpha$  amino do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

Já no caso da assimilação de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes, a mesma requer grande quantidade de moléculas de 2-oxo-glutarato, oriundo do ciclo dos ácidos tricarboxílicos no mitocôndrio, após degradação glicolítica de sacarose importada das folhas (MILLER & CRAMER, 2004). Como produto final desse processo, verifica-se um alto acúmulo de espécies de N-amino nas raízes (Figura 33 D), que incluem, de acordo a literatura, a presença de glutamato e aspartato e possivelmente arginina (RUAN et al., 2007), assim como as formas N-amido, glutamina e asparagina, todos compostos caracterizados pela baixa relação C:N, e portanto eficientes na neutralização do  $\text{NH}_4^+$  livre e no seu

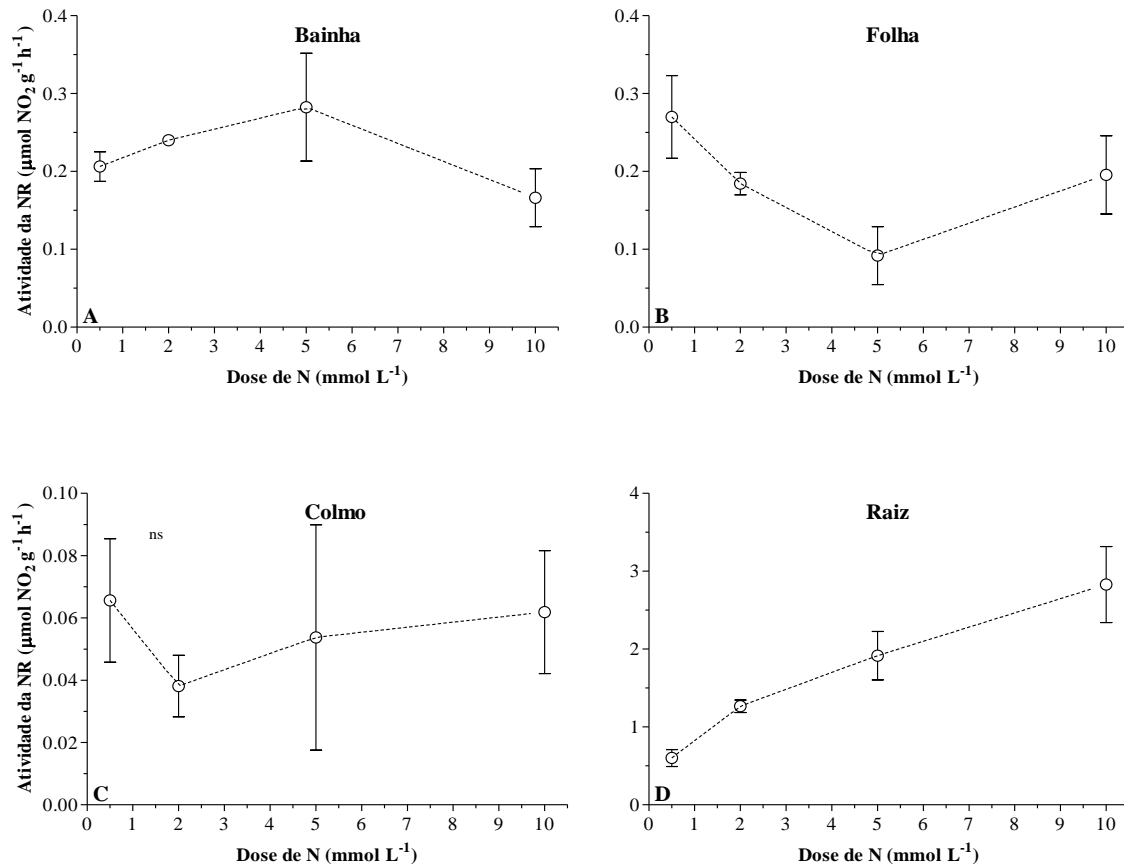


transporte à parte aérea. Tomados em conjunto, esses resultados apontam para uma superior capacidade assimilatória de N em plantas do capim Tifton 85 cultivadas com N na forma amoniacal, do que na forma nítrica.

De uma forma geral, a assimilação do nitrato absorvido verifica-se tanto em folhas quanto em raízes. A distribuição do processo de assimilação através das plantas varia com fatores tais como espécie vegetal; parte da planta, idade e fatores ambientais, dentre os quais o suprimento externo de nitrato assume importância principal (SCHRADER et al., 1972; RAO & RAINS, 1976; FERNANDES et al., 1985; SMIRNOFF & STEWART, 1985; SCHEURWATER et al., 2002).

Em relação à atividade da nitrato redutase (ANR) na bainha, a análise de variância indicou efeitos significativos para dose de N ( $p=0,0063$ ), DAC ( $p<0,0001$ ) e para interação dose x DAC ( $p=0,0004$ ). Nas lâminas foliares houve efeitos significativos para dose de N ( $p<0,0001$ ) e para interação dose x DAC ( $p=0,0119$ ). Nos colmos, a ANR foi responsiva ao fator DAC ( $p<0,0001$ ) e à interação dose x DAC ( $p=0,0221$ ). Quanto à ANR nas raízes, a mesma resultou afetada por dose de N, DAC e para interação dose x DAC ( $p<0,0001$ ).

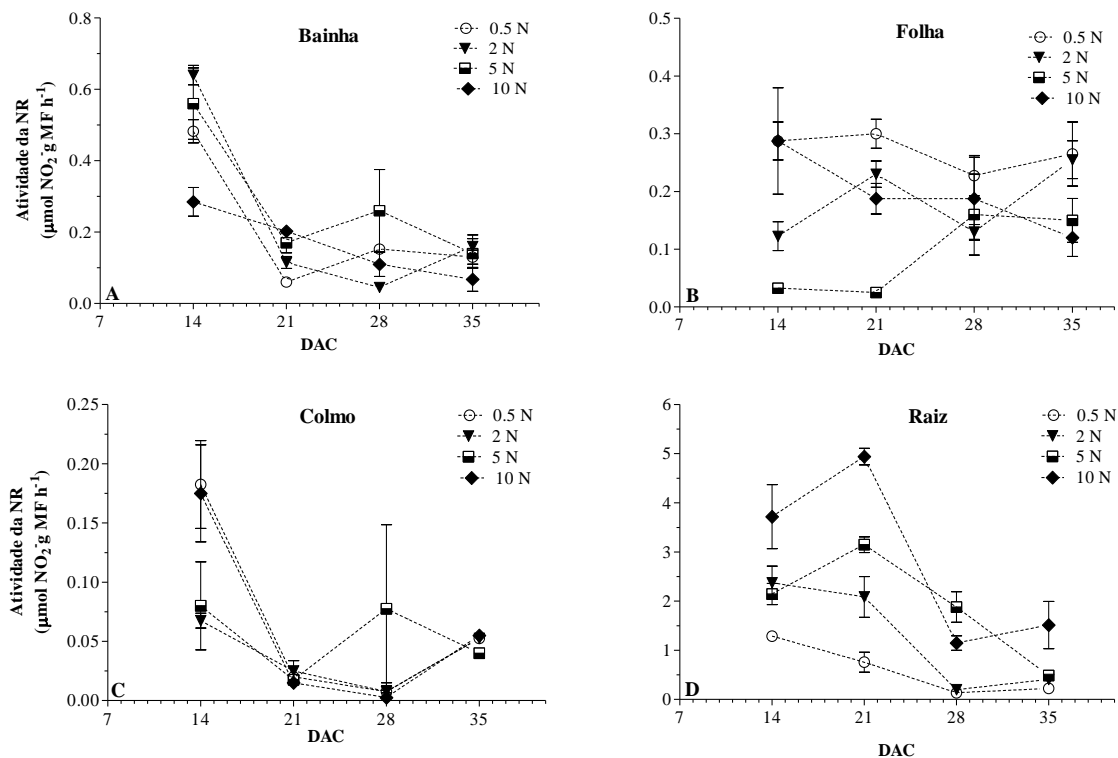
No relativo ao efeito das doses de N, as médias, independentes de DAC, são apresentadas na figura 34. Os principais aspectos emergentes das tendências de resposta da ANR já foram considerados na discussão prévia. Adicionalmente, os dados confirmam que, diferentemente do evidenciado em outras gramíneas forrageiras, no Tifton 85 o principal local de redução e assimilação do nitrato absorvido é o sistema radicular. Nos outros compartimentos, as ANR foram baixas, independentemente dos teores de  $\text{NO}_3^-$  residentes nesses compartimentos (Figura 32). Isto reflete o fato de que o fator indutor da ANR não é a concentração média de  $\text{NO}_3^-$  nos tecidos analisados (que é o que estima o método de determinação), senão os fluxos citossólicos de  $\text{NO}_3^-$ , os quais representam uma fração apenas do  $\text{NO}_3^-$  total a nível celular (KAWACHI et al., 2002), e não podem ser substituído pelo  $\text{NO}_3^-$  alocado no “*pool* substrato” na sua capacidade de induzir nova síntese da proteína Nitrato Redutase (SOUZA & FERNANDES, 2006).



**Figura 34.** Atividade média da nitrato redutase (ANR) no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva com quatro doses de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão da média.

Jiang et al. (2002), conduziram um experimento, similar ao presente, no qual cultivaram três forrageiras C<sub>3</sub> (*Poa pratensis* L.; *Lolium perenne* L. e *Festuca arundinacea* Schreb.) junto com *Cynodon dactylon* [L.] Pers., em solução nutritiva de Hoagland contendo 0,5 ou 5,0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Esses autores verificaram que, contrariamente à hipótese inicial, a grama bermuda (C<sub>4</sub>) não teve taxas de absorção de nitrato maiores que as das gramíneas C<sub>3</sub>, além do que a sua ANR resultou consistentemente menor. Todavia, o *Cynodon* alocou uma fração maior de sua massa fresca e de sua ANR total nas raízes, em comparação com as plantas C<sub>3</sub>, o que, de acordo com os autores, lhe conferiu maior eficiência de uso de N na sua parte aérea.

No relativo às tendências temporais de variação da ANR, houve padrões discerníveis no caso da bainha e colmos, onde há uma tendência exponencial de declínio da atividade, entre 14-28 DAC, que deve refletir a progressiva redução do fluxo indutor de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> com o avanço do período de rebrota. A variação semanal de atividade da NR nas folhas, embora de baixa expressão, mostrou-se mais estável, embora não se possa estabelecer qualquer relação consistente com as concentrações externas de nitrato (Figura 35 A).

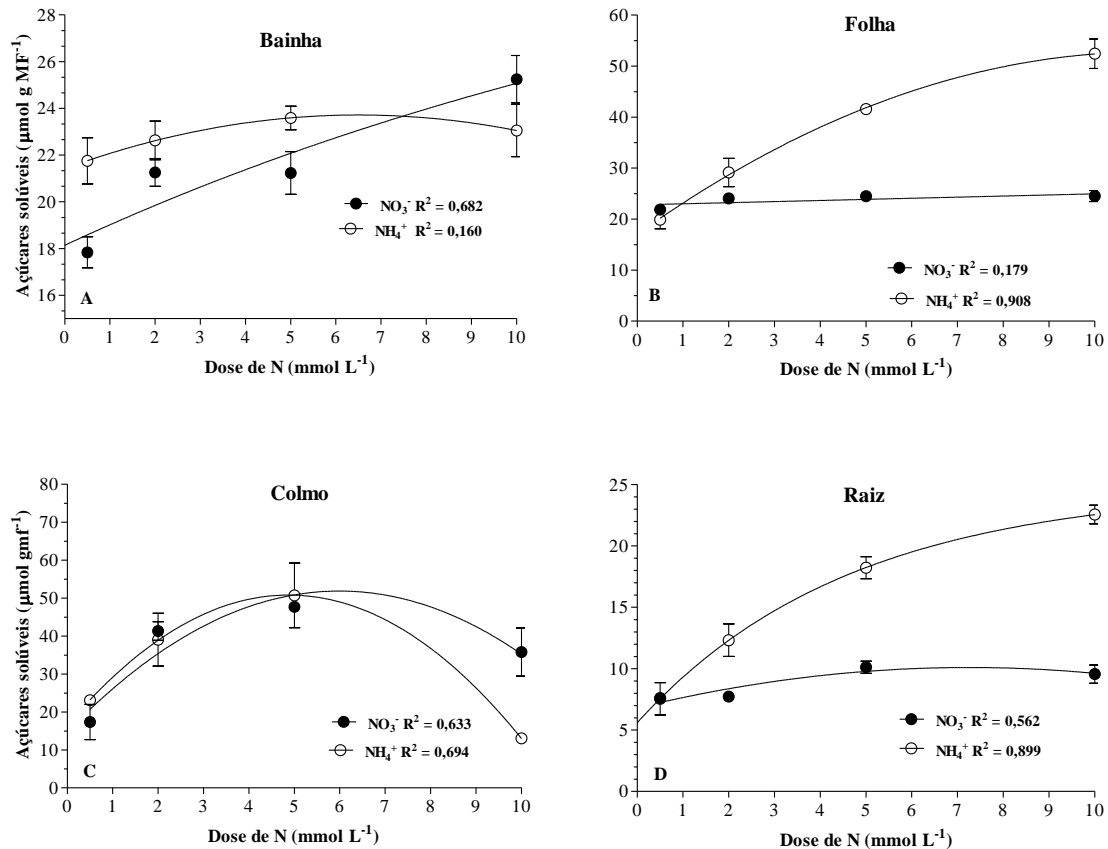


**Figura 35.** Variação temporal da atividade da enzima redutase do nitrato em partes do capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva em função de doses de N aplicadas. A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

#### 4.1.5.5. Açúcares solúveis.

O estudo do nível de açúcares solúveis (AS) em plantas é de interesse porque ele é indicativo da energia prontamente disponível no tecido vegetal. Dessa forma, processos dependentes de energia metabólica (tais como absorção, transporte e acumulação de íons) são afetados por variações nos seus teores (ROSSIELLO et al., 1981).

Em relação aos teores de açúcares solúveis na bainha, a análise de variância indicou efeitos significativos para dose de N e DAC ( $p<0,0001$ ) e para as interações dose x DAC ( $p=0,0135$ ) e forma de N x DAC ( $p<0,0001$ , Figura 36A). Para os teores de açúcares solúveis na lâmina foliar, o teste F indicou efeitos significativos para forma de N, dose e DAC ( $p<0,0001$ ), assim como para a interação entre forma de N x dose (Figura 36B); forma x DAC e dose x DAC ( $p<0,0001$ ). Nos colmos, os valores de açúcares solúveis foram afetados significativamente pela forma de N ( $p=0,0266$ ) dose ( $p<0,0001$ ) e DAC ( $p=0,0173$ ), assim como pelas interações forma x DAC ( $p=0,0004$ ); dose x DAC ( $p=0,0063$ ) e forma x dose de N ( $p<0,0001$ , Figura 36C). Os teores de açúcares solúveis nas raízes responderam à forma de N; dose e DAC ( $p<0,0001$ ), assim como as interações forma de N x dose, forma x DAC ( $p<0,0001$ ) e dose x DAC ( $p=0,0002$ ) (Figura 36).



**Figura 36.** Variação nos teores de açúcares solúveis no capim Tifton 85, cultivado em solução nutritiva, em resposta a duas formas de N mineral, e quatro doses de aplicação. A) bainha; B) lâmina foliar; C) colmo; D) Raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

A primeira constatação a ser feita é que ao menos até o nível de 5 mM, as concentrações de AS foram maiores nas plantas sob nutrição amoniacal, à exceção do componente colmo (Figura 36 C). Sob  $\text{NH}_4^+$ , as plantas acumularam níveis de açúcares solúveis que, na máxima dose aplicada, excederam entre 2,5 (folhas) e 4 vezes (raízes) os teores de AS nas plantas sob nutrição nítrica, os quais se mantiveram dentro de um nível basal, independentemente de concentração (Figuras 36 B e D). Já os colmos mostraram uma capacidade limitada de acumulação de AS, que declinou acima de 5,0 mM, independente da forma de N (Figura 36 C). Em relação às bainhas, plantas sob  $\text{NH}_4^+$ , aparentemente tiveram uma maior capacidade de “tamponamento” das concentrações de AS nos seus tecidos, em comparação com os das plantas sob nutrição nítrica, os quais aumentaram linearmente e de forma crescente, talvez porque as quantidades de carboidratos (presumivelmente sacarose) exportadas pelo floema tenham sido menores que às correspondentes à nutrição amoniacal. Com efeito, não pode ser excluído que, a maior abundância de AS nas plantas sob nutrição amoniacal reflita, de fato, maiores taxas de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  na parte aérea, tal como discutido previamente (item 4.1.5.2). Alternativamente, mais baixos teores de AS nas raízes das plantas supridas com  $\text{NO}_3^-$  pode refletir o fato de que, como a assimilação de nitrato é energeticamente mais custosa do que a amoniacal, o consumo de AS tenha sido maior sob nutrição nítrica.

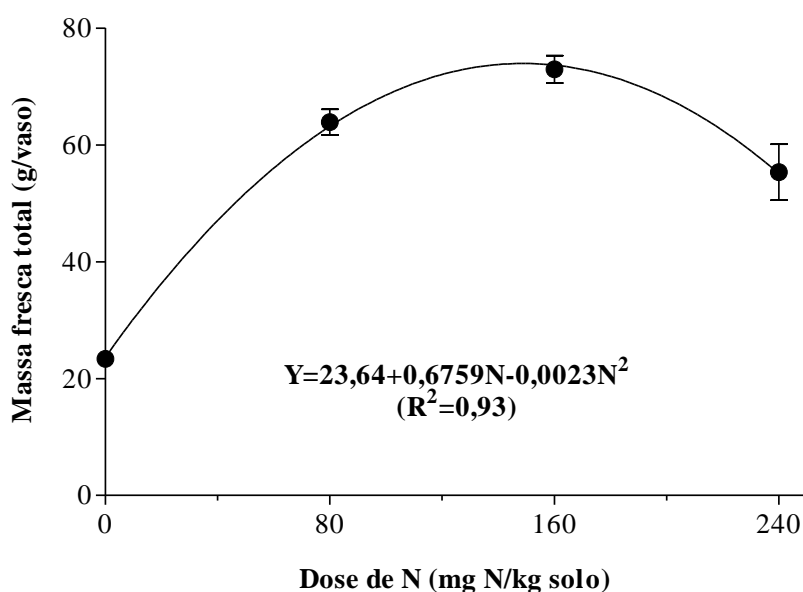
Neste contexto, este perfil de distribuição de AS nos compartimentos morfológicos, é completamente diverso do verificado em outras espécies, em que a assimilação radicular de  $\text{NH}_4^+$  é sinônimo de crescimento radicular estagnado, depleção de açúcares solúveis prontamente assimiláveis, com reduções na relação raiz/parte aérea e na massa fresca (MAGALHÃES & HUBER, 1989). Contrariamente, o capim Tifton 85 respondeu à nutrição amoniacal, em confronto com a nutrição nítrica, com maior massa fresca e massa seca total, maior alocação às raízes, maior teor de clorofila total e maiores teores de açúcares solúveis e aminoácidos em folhas e raízes.

## 4.2 Experimentação em Casa de Vegetação (Experimento II)

O propósito do segundo experimento foi verificar o comportamento do capim Tifton 85 quando cultivado com nitrato de amônio como fonte de N, em casa de vegetação.

### 4.2.1 Efeitos das variáveis experimentais sobre o crescimento: massa fresca

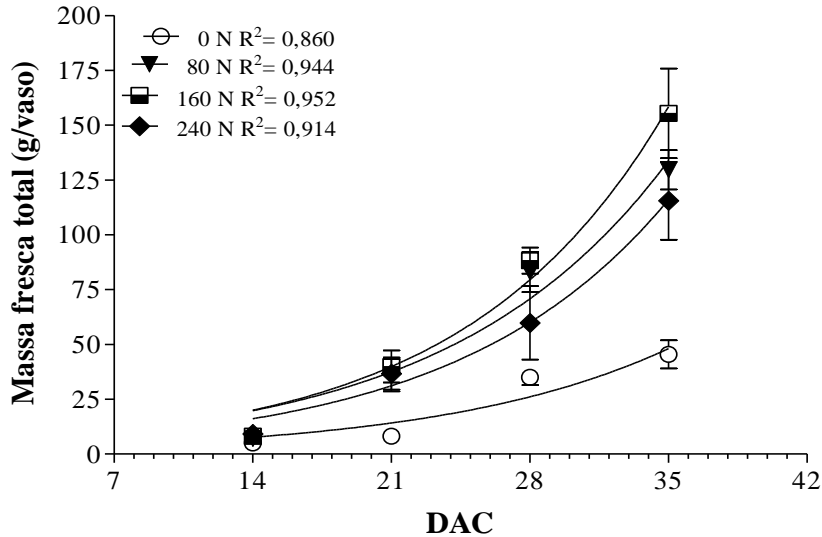
A análise de variância para os valores relativos à massa fresca total das plantas indicou efeitos significativos para dose de N e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para a interação dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Em relação ao efeito médio das doses de N, isoladamente, o mesmo ajustou-se a um modelo quadrático com  $R^2 = 0,93$  (Figura 37), o qual atingiu o seu valor máximo com uma dose de  $147 \text{ mg N kg solo}^{-1}$ .



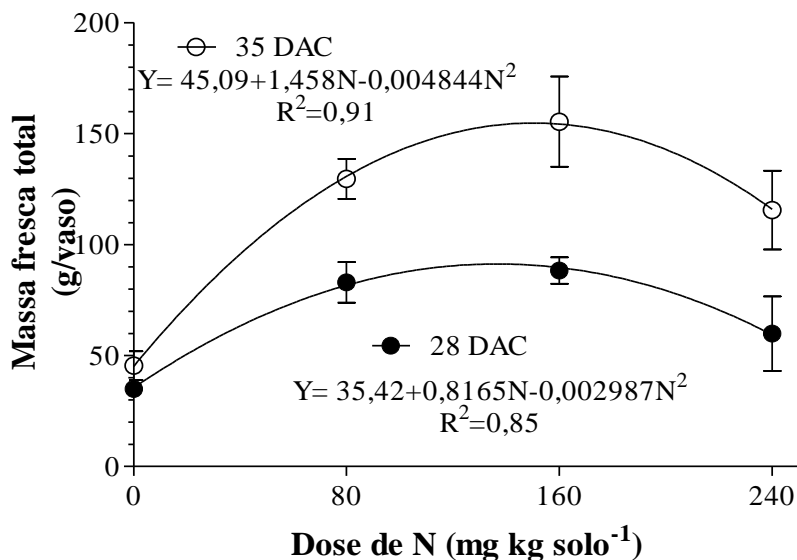
**Figura 37.** Produção de massa fresca total do capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em resposta à aplicação de quatro doses de N na forma de nitrato de amônio. Barra vertical indica o erro padrão da média de quatro repetições por dose experimental.

Na figura 38 são apresentados os valores relativos à interação entre doses de N e dias após o corte de uniformização. As tendências temporais de crescimento foram descritas por uma curva exponencial simples. As doses de N adicionadas imprimiram velocidades diferenciadas, de  $87 \text{ mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  para o tratamento controle até  $99 \text{ mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  para a aplicação de  $160 \text{ mg N kg solo}^{-1}$ . Já a taxa de crescimento relativo do capim na maior dose de N aplicada, foi de  $93 \text{ mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , evidenciando, então, o efeito depressivo de um excesso de adubação nitrogenada sobre os processos responsáveis pelo acúmulo

de massa fresca. Uma focalização mais precisa disso, pode ser observada na figura 39, na qual se mostra o desdobramento do padrão quadrático de resposta à adubação nitrogenada, durante os 28 e 35 DAC, que corresponde à faixa de idade de rebrota no qual o dossel de Tifton 85 atinge, sob condições de campo, um índice de interceptação luminosa de 95%, durante a estação chuvosa (BARBIERI JUNIOR, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; ROSSIELLO & ANTUNES, 2012).



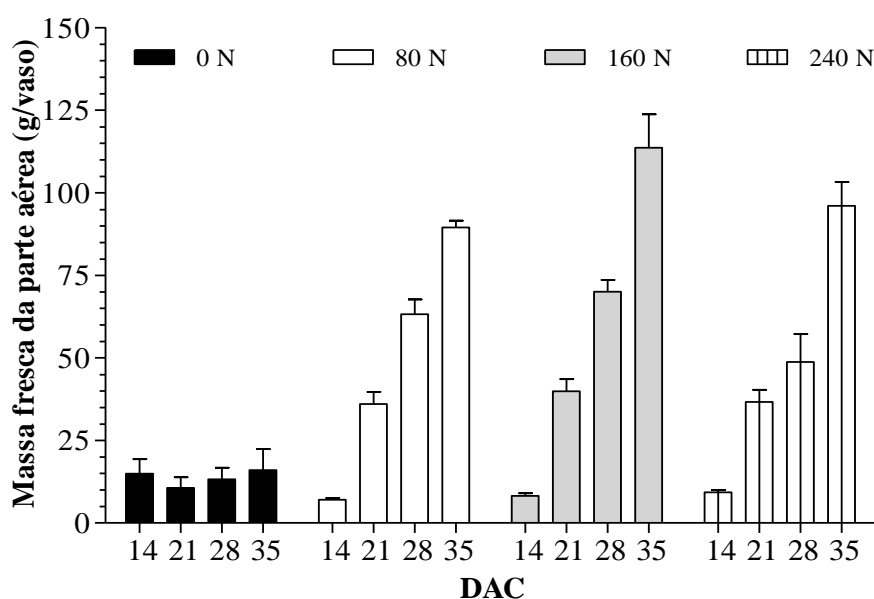
**Figura 38.** Variação temporal da massa fresca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em casa de vegetação, em resposta a quatro doses de nitrito de amônio. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.



**Figura 39.** Produção de massa fresca total do capim Tifton 85, aos 28 e 35 dias de rebrota, em função de doses de N aplicadas. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por ponto.

A análise de variância para os valores correspondentes à massa fresca da parte aérea indicou efeitos significativos para dose de N e DAC ( $p<0,0001$ ), assim como para

a interação dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Na figura 40 são apresentados os valores de produção de massa fresca da parte aérea em função das doses de N.

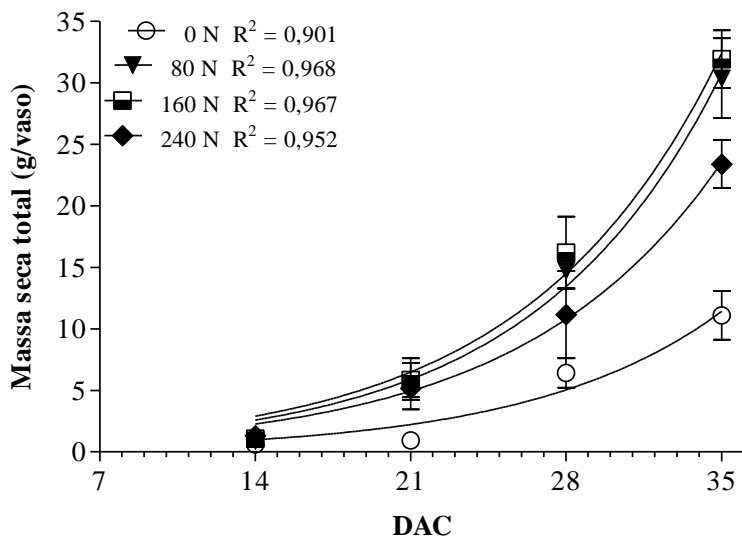


**Figura 40.** Massa fresca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85, em resposta a quatro doses de N mineral e quatro idades (DAC) das plantas. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

Na figura anterior é possível observar a capacidade de resposta do capim Tifton 85 nas diferentes doses ao longo do tempo. O maior contraste ( $> 6x$ ) foi observado aos 35DAC, entre as doses de  $160 \text{ mg N kg solo}^{-1}$  e o tratamento controle, cujo baixo acúmulo de MS reflete, certamente, o baixo teor de N mineral disponível no solo, em função da sua textura superficial arenosa e limitado teor de carbono orgânico nativo (Tabela 4).

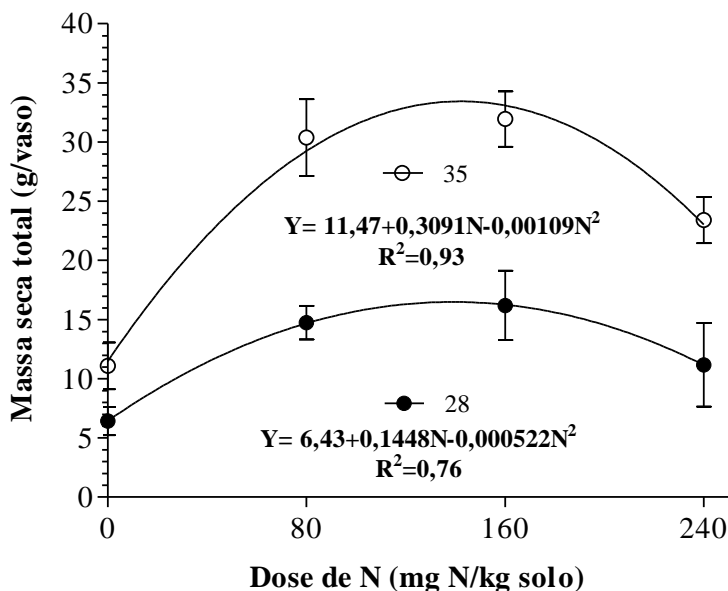
#### 4.2.2. Massa seca

Para os parâmetros relativos à massa seca de plantas houve efeitos significativos da dose e DAC ( $p < 0,0001$  para ambos), assim como para a interação dose x DAC ( $< 0,0001$ ). Da mesma forma que o observado com a massa fresca total, na massa seca total o melhor ajuste observado foi o exponencial. O efeito da interação entre doses de N e DAC é apresentado na figura 41.



**Figura 41.** Variação temporal da massa seca total produzida pelo capim Tifton 85 cultivado em casa de vegetação, em resposta a quatro doses de nitro de amônio. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

O maior contraste em termos de produção de massa seca correspondeu à dose de 160mg N kg solo<sup>-1</sup> em relação ao controle, aos 35DAC, da ordem de 190% ( $p<0,05$ ) (31,94 vs. 11,09 g vaso<sup>-1</sup>, respectivamente). De forma geral, os dados de massa seca acompanharam todas as tendências verificadas na massa fresca, como mostram os dados relativos aos 28 e 35DAC (Figura 42).

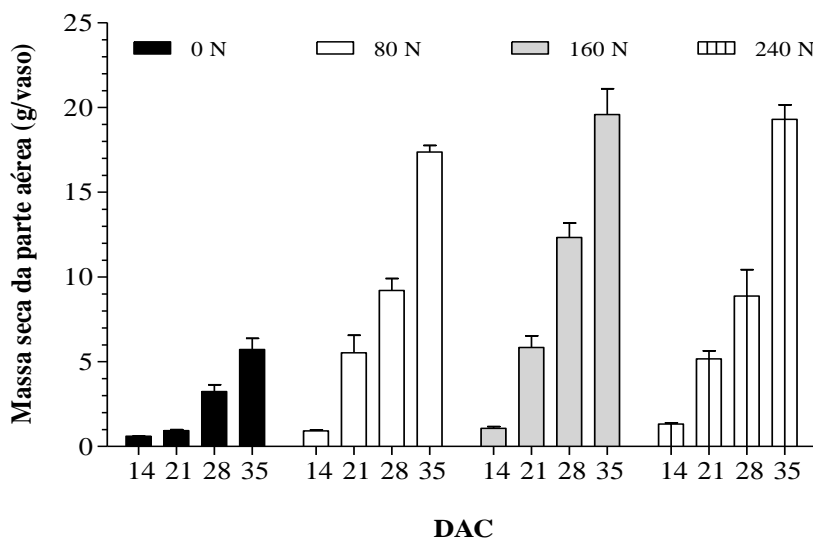


**Figura 42.** Produção de massa seca total do capim Tifton 85, aos 28 e 35 dias de rebrota, em função de doses de N. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por ponto.

Vale observar ainda dois aspectos importantes. O primeiro diz respeito ao grande acúmulo de massa seca registrado neste intervalo das duas coletas, possivelmente influenciado pela magnitude da área foliar acumulada até os 28 DAC. O segundo ponto a ser considerado é a queda maior que 32% ( $p<0,05$ ) observada no



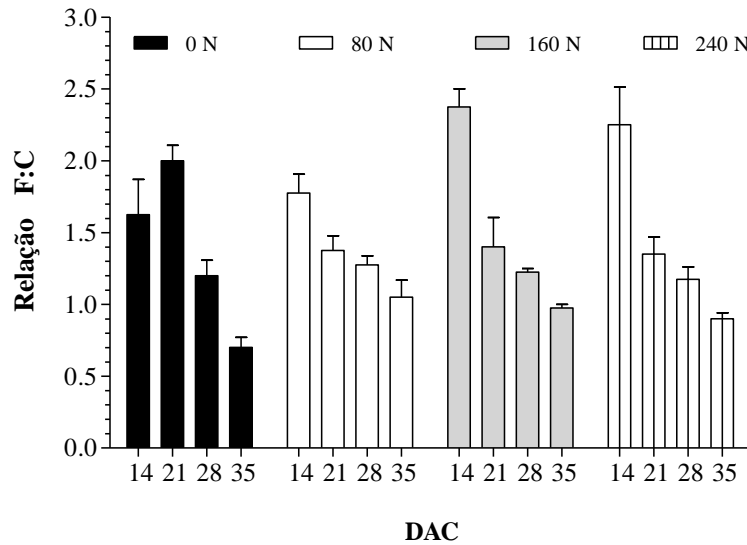
acúmulo de massa seca registrado entre as doses de 160 e 240 mg N kg solo<sup>-1</sup> aos 35 DAC (31,94 vs. 24,15 g vaso<sup>-1</sup>, respectivamente). Na figura 43, são apresentados os valores de acúmulo de massa seca da parte aérea para cada dose nas quatro épocas avaliadas.



**Figura 43.** Massa seca da parte aérea produzida pelo capim Tifton 85, em resposta a quatro doses de N mineral e quatro épocas de coleta. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  repetições por tratamento.

#### 4.2.3. Relação folha/colmo

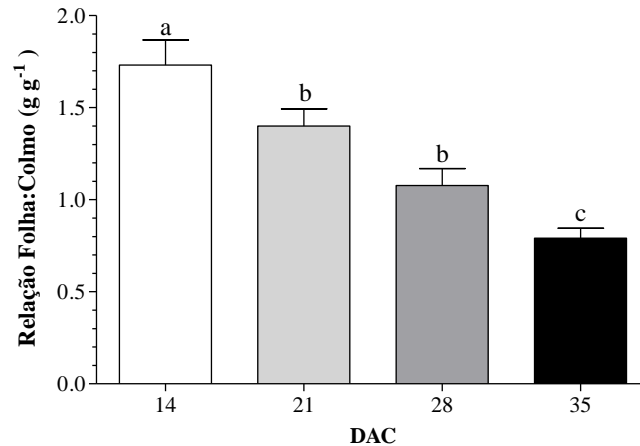
Em relação à alocação da massa seca da parte aérea, expressa pela relação folha:colmo, observaram-se efeitos interativos entre dose de aplicação e DAC (Figura 44). Da mesma forma que o observado em cultivo hidropônico (Figura 24), a relação F:C apresentou queda gradual entre 14 e 35 DAC, justificando o efeito significativo para DAC (Figura 44). Evidentemente, a mudança do ambiente de crescimento e da forma mista de N aplicada ( $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ = 1:1$ ) complicam a comparação direta com os valores de F:C determinados no fitotron, os quais resultaram bastante inferiores (Figuras 22-24). Também os valores obtidos em condições de campo aparecem como menores (a referência supracitada do trabalho de Oliveira, 2008) se bem que a faixa de contraste é menor: os presentes dados são similares ao valor observado por Neres et al., (2012), de 1,33 para o primeiro ciclo do Tifton 85, com aplicação de 150 kg N/ha, em parcelamentos de 50 kg N/ha/corte.



**Figura 44.** Variação da relação folha/colmo em plantas de capim Tifton 85 cultivadas em solo, sob condições de casa de vegetação, em função da dose e dias após corte de uniformização (DAC). Barra vertical indica erro padrão de  $n=12$  valores por tratamento.

Tanto no caso do experimento de Oliveira (2008) quanto o de Neres et al. (2012), a fonte do adubo nitrogenado foi a ureia. Assim, poderia se supor, nos dois casos, que o crescimento do capim tivesse sido feito na dependência de relações variadas  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  no solo, capazes de induzir plasticidade fenotípica para este atributo morfológico. De fato, segundo Oliveira (2008), que revisou dados publicados de diferentes procedências, é isso que acontece. Considerando-se a destinação final do capim, é evidente a vantagem de uma elevada relação folha/colmo, já que a mesma representa uma maior participação das folhas na composição do pasto. Uma maior proporção de folhas está diretamente relacionada com maiores teores de proteína, maior digestibilidade da MS e maior consumo animal. A seleção de forragens com maior relação F:C, proporciona à gramínea melhor adaptação ao pastejo ou tolerância ao corte, garantindo recuperação mais rápida do dossel no pós pastejo (PEREIRA et al., 2012).

A diminuição dos valores de relação F:C observada nas figuras 44 e 45 com o aumento da idade do capim Tifton 85 está relacionada ao crescimento em altura da forragem. Isso porque, para colocar maior quantidade de folhas em estratos superiores do dossel, existe a necessidade de investir em estruturas de sustentação (colmos), o que se traduz em redução do percentual das folhas na parte aérea do dossel (PEREIRA et al., 2012).

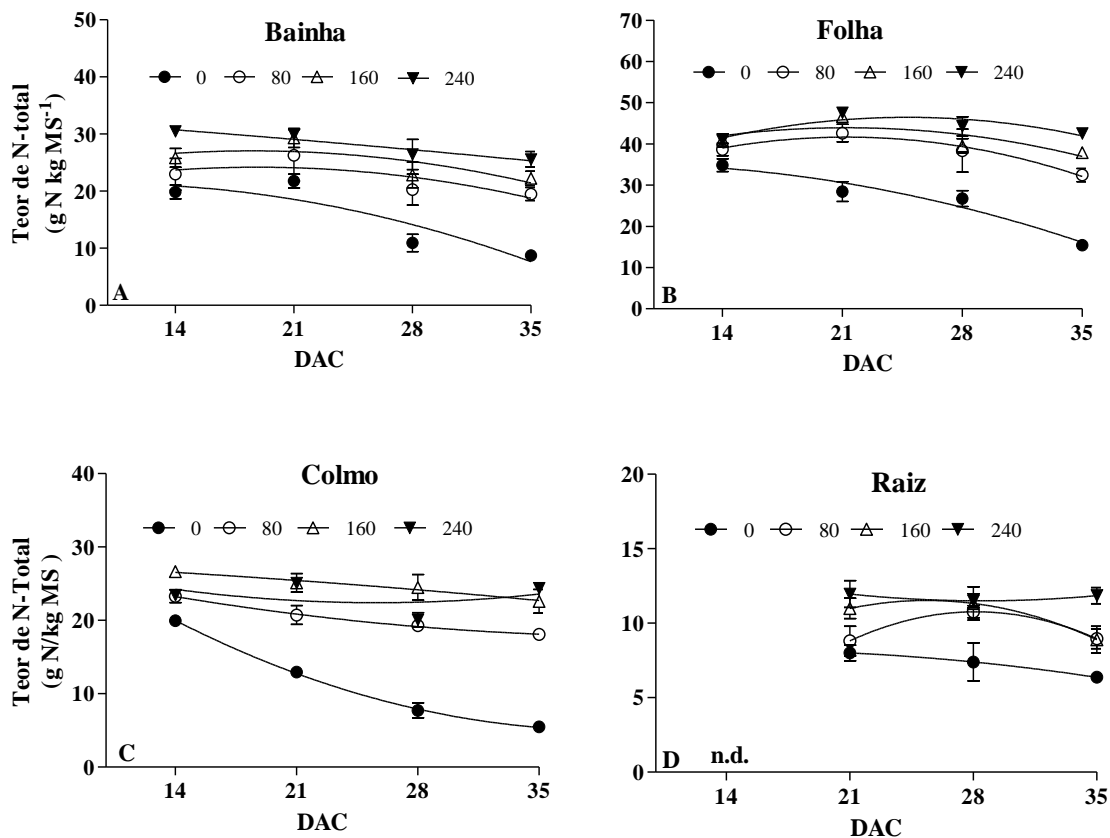


**Figura 45.** Variação temporal da relação folha colmo no capim Tifton 85 cultivado em vasos com solo, em casa de vegetação, com quatro doses de nitrato de amônio. Barra vertical indica o erro padrão da média.

#### 4.2.4 Variáveis relacionadas ao metabolismo da planta: nitrogênio total, N-amônio, N-nitrato, N-amino e atividade da nitrato redutase (ANR).

Para os teores de N total na bainha, a análise estatística indicou significância para efeitos de dose de N e DAC ( $p < 0,0001$ ), assim como para a sua interação ( $p = 0,0007$ ). Já para os teores em folhas, houve efeito de dose de N e DAC ( $p < 0,0001$ ) e da sua interação ( $p < 0,0001$ ). Nos colmos, houve efeitos para dose de N, DAC e para a sua interação ( $p < 0,0001$ ). O teor de N nas raízes foi afetado significativamente pela dose de N, pelo DAC e pela interação ( $p < 0,0001$ ).

Na figura 46 são apresentados os dados correspondentes à interação dose x DAC. Para bainhas e lâminas foliares, foi observada tendência bastante similar, caracterizada pela progressiva redução das concentrações de N, de acordo ao avanço do período de rebrota, redução essa modulada pelas doses de N (Figura 46 A e B). Tal fato pode ser melhor observado na amostragem realizada aos 35 DAC, quando foram registrados os maiores contrastes entre os tratamentos (194 e 176%) para bainhas e lâminas foliares, respectivamente (bainha= 25,6 vs. 8,7 g N/kg MS e para lâminas= 42,6 vs. 15,4 g N/kg MS). Por outro lado, a maior magnitude absoluta de redução, dentro do tratamento, correspondeu, ao controle não adubado (Figura 46 A e B). Deve se ter em mente que entre os 28 e 35DAC houve redução na taxa de crescimento do capim (Figura 41), com queda na produção de massa seca total (Figura 41).



**Figura 46.** Variação temporal (DAC) nos teores de N total no capim no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  observações. n.d.= Não determinado

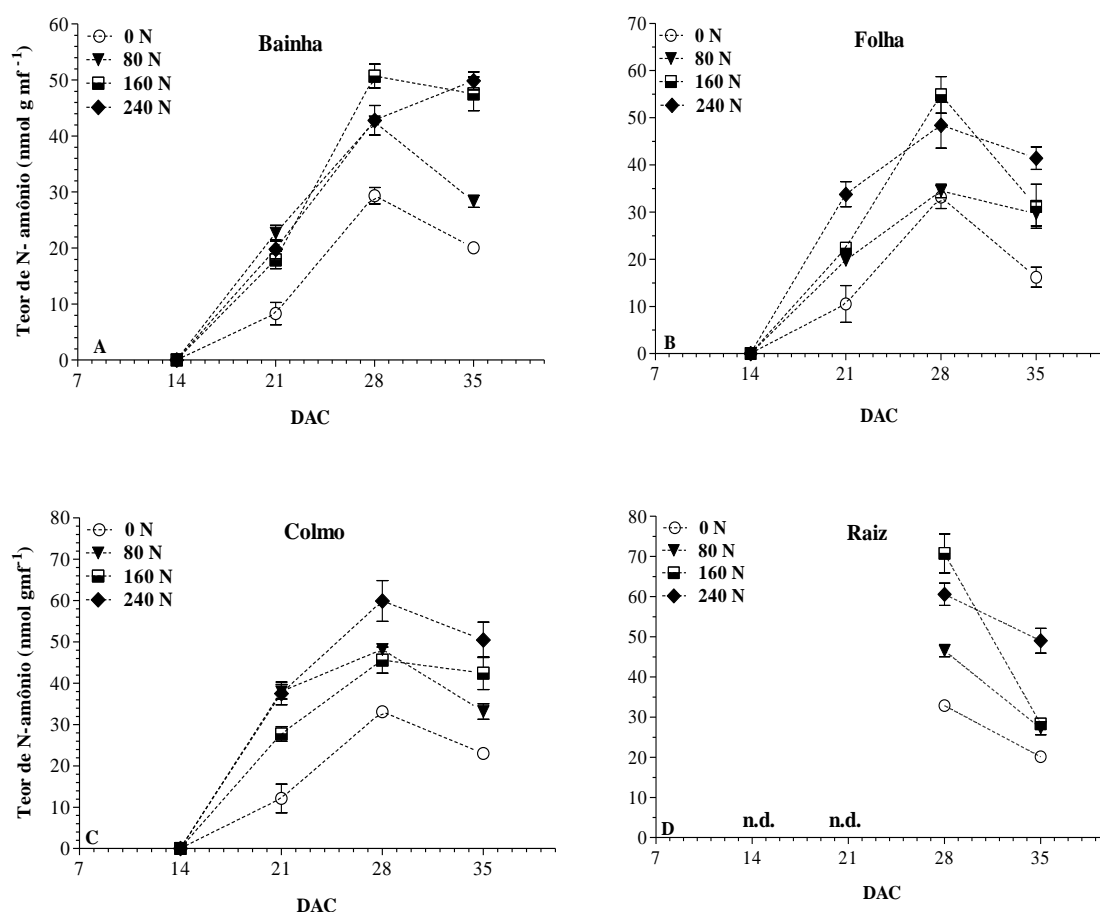
Assim, cabe inferir que houve retenção de N nas lâminas foliares, já que para os tratamentos que receberam N, não houve redução dos valores aos 35 DAC, em relação aos valores de 14 DAC (p.ex: 42,6 vs. 40,9 g N/kg MS, em 240N, respectivamente). Entretanto, para o controle, houve sim variação significativa ( $p<0,005$ ) dos teores de N total nas lâminas, refletindo a baixa disponibilidade natural de N deste solo, como já observado anteriormente. Resultados similares a este, podem ser observados em ambiente natural, sobre o mesmo solo, nos trabalhos de Oliveira (2008), Barbieri Junior (2009) e Silva (2009). Para os colmos, houve certa estabilidade nos valores observados de N total ao longo do período de rebrota para aqueles tratamentos que receberam doses de N. Já em relação ao tratamento controle, se observa queda acentuada nos teores de N total durante o período de 14-35 DAC, quando foi registrada queda de 262% (19,9 vs. 5,47). Nas raízes, também houve estabilidade nos teores de N total referentes ao início e fim de ciclo (21-35 DAC) para todos os tratamentos. Os maiores contrastes observados foram entre as doses de 240 e 0N para a data de 35 DAC, que resultou em 84% (11,8 vs. 6,4, respectivamente). Independentemente de valores absolutos, os mesmos padrões de estabilidade dos teores de N total foram verificados no experimento em solução nutritiva (Figura 29), quando, no entanto, não se verificou queda no acúmulo de massa seca.

Do ponto de vista nutricional, os teores de N nas lâminas foliares sempre estiveram acima do nível mínimo de N-protéico necessário para o bom funcionamento

do rúmen (7% PB), confirmando novamente a grande importância de se buscar elevar a relação folha/colmo. Resultados semelhantes, em termos de concentração de N-protéico foram encontrados por outros autores também com o capim Tifton 85 (PREMAZZI & MONTEIRO, 2002; BARBIERI JUNIOR, 2009; NERES et al., 2012).

Em relação aos teores de N-amônio na bainha, a análise de variância indicou efeitos significativos para dose de N e DAC ( $p < 0,0001$ ) e para a interação dose x DAC ( $p = 0,0009$ ). Na lâmina foliar, houve significância para dose de N, DAC e para a interação dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Para a fração colmos, houve efeitos significativos para dose de N, DAC, e para a interação ( $p < 0,0001$ ), da mesma forma que para as raízes.

Na figura 47 (A-D), são apresentados os teores de N-amônio observados, nas quatro frações morfológicas, em função das doses de N e dos dias após o corte de uniformização. De forma geral, os teores revelaram ausência de acúmulo de níveis potencialmente tóxicos de amônio nas plantas, independentemente de flutuações temporais e doses de N aplicadas, confirmando o resultado obtido nas condições ambientais mais restritas da câmara de crescimento. Deve ser observado que, mesmo dentro da faixa sub-micromolar, esses teores guardaram relação com as doses de N aplicadas.



**Figura 47.** Variação temporal nos teores de N-amônio no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  observações. n.d.= não determinado.

Uma classificação utilizando ordem decrescente de teores de N-amônio obedeceria à seguinte escala: raízes > colmo > folha > bainhas. Tais resultados são justificados pelo fato das raízes serem o local de absorção do amônio, como discutido no experimento anterior.

Foram observados valores picos, aos 28 DAC, tanto para bainhas ( $51 \text{ nmol g MF}^{-1}$ ), quanto para lâminas foliares ( $55 \text{ nmol g MF}^{-1}$ ), naqueles tratamentos que receberam a dose de  $160 \text{ mg dm}^3 \text{ Kg solo}^{-1}$ . Entretanto, os maiores contrastes em ambos os compartimentos foram observados aos 35 DAC, entre os tratamentos de 240N e o controle. Os valores percentuais observados de incremento foram de 149% ( $49,8 \text{ vs. } 20$ ) para bainhas foliares e de 155% superior no caso das lâminas ( $41,4 \text{ vs. } 16,2$ ) (Fig. 47 A e B).

Nos colmos o maior valor médio foi registrado aos 28DAC, para o tratamento de  $240 \text{ mg N kg solo}^{-1}$ , quando os teores de N-amônia atingiram os  $59,9 \text{ nmol/g MF}^{-1}$  (Fig. 47 C). Na amostragem seguinte aos 35 DAC foram registradas as maiores amplitudes de N-amônio entre as doses de N, que ocorreu entre as doses de  $240 \text{ mg N kg solo}^{-1}$  e o controle, atingindo o percentual de 119% de superioridade em relação ao controle ( $50,5 \text{ vs. } 23$ , respectivamente). Nas raízes o maior valor foi observado aos 28DAC, período em que também foram registrados os maiores contrastes (115%) entre os tratamentos, quando foram registrados os valores médios de  $70,7 \text{ vs. } 32,8$ , para os tratamentos de maior dose e controle, respectivamente (Fig. 47 D).

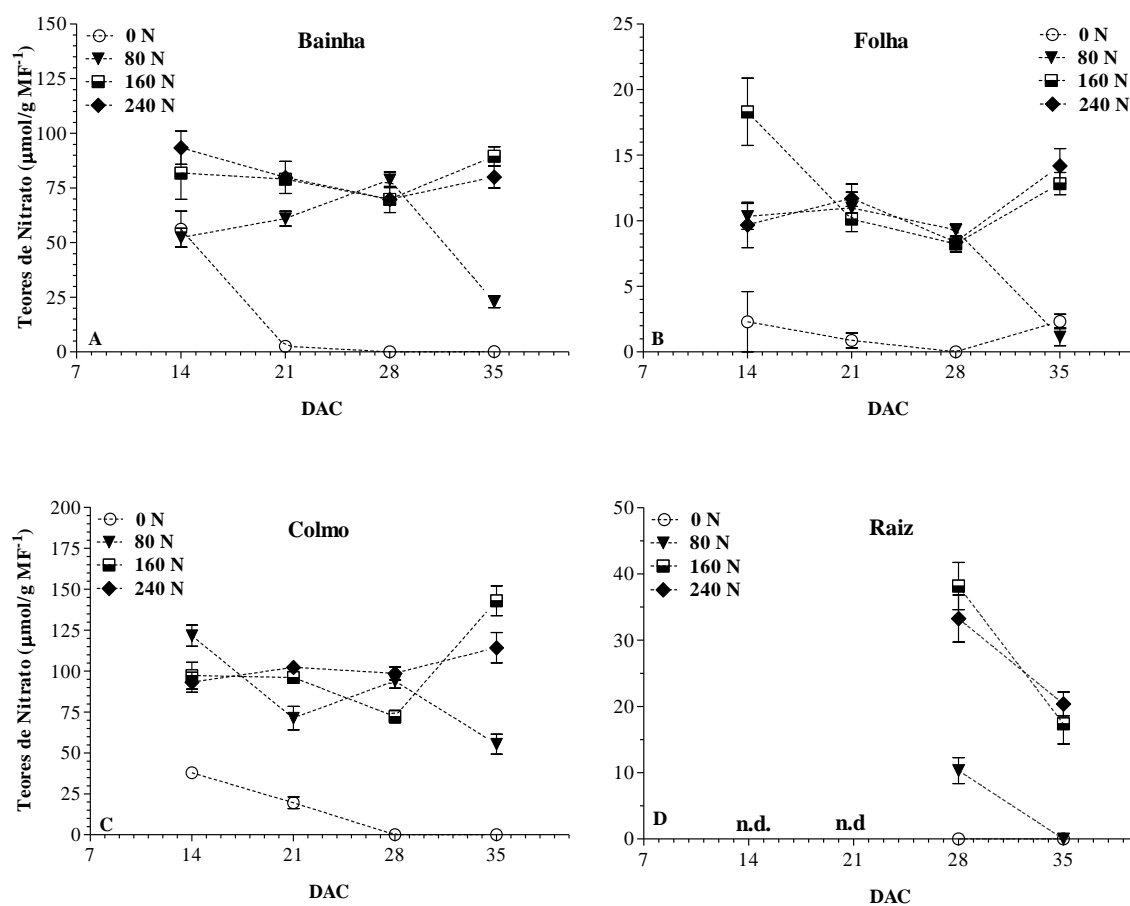
Estudando duas cultivares de milho (crioula e melhorada), Borges et al., (2006) encontraram teores de  $\text{N-NH}_4^+$  em bainhas e colmos variando desde  $0,2 \text{ } \mu\text{mol de NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1}$  para plantas adubadas com  $13 \text{ mg de N kg}^{-1} \text{ solo}$ , até valores de  $4 \text{ } \mu\text{mol de NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1}$  para plantas adubadas com  $130 \text{ mg de N kg}^{-1} \text{ solo}$ . Verifica-se que o menor teor encontrado por esses autores, excede entre 3-4 vezes os verificados no presente estudo ( $0,05\text{-}0,07 \text{ } \mu\text{mol de NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1}$ ), em bainhas e colmos, considerados no pico de sua acumulação temporal (28 DAC) com uma dose de N, no mínimo, 12 vezes maior ( $160:13$ ). Esses resultados em conjunto com os obtidos no ambiente controlado (Figura 31), permitem sugerir, com bastante convicção, que o capim Tifton 85 possui uma configuração metabólica tal que lhe permite reduzir ao mínimo os teores de  $\text{NH}_4^+$  em qualquer parte da planta. Dito de outra forma, possui uma elevada eficiência assimilatória em relação a essa forma de N. Seria interessante portanto, a realização de estudos mais específicos, visando determinar os níveis de expressão gênica da família de transportadores AMT, especificamente do tipo AMT2, responsáveis pelo transporte do  $\text{NH}_4^+$  em concentrações externas de amônio  $>1,0 \text{ mM}$  (SOUZA & FERNANDES, 2006). Ainda, existe a possibilidade da existência de outros mecanismos passíveis de regulação por produtos do metabolismo de N, conforme tem sido postulado na literatura (FOYER et al., 2003; MILLER et al., 2007; LEA & MIFLIN, 2011). Nesse sentido é interessante a observação de que, diferentemente do que acontece com um transportador de  $\text{NO}_3^-$ , é o “*status*” local da raiz, melhor do que o “*status*” nitrogenado da planta inteira, o que regula a expressão de um transportador de  $\text{NH}_4^+$  (MILLER et al., 2007).

Em relação aos teores de  $\text{N-NO}_3^-$  na bainha, a análise de variância indicou efeitos significativos para dose de N; DAC e para a sua interação ( $p < 0,0001$ ). Nas lâminas foliares, os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  resultaram afetados pela dose de N ( $p < 0,0001$ ); DAC ( $p < 0,0001$ ) e para a interação entre dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Para o componente colmo, houve significância para dose; DAC e para a sua interação ( $p < 0,0001$ , Figura 48 C). Mesmos níveis de significância foram obtidos para as raízes, com a ressalva de que neste componente não foi possível realizar as coletas aos 14 e 21 DAC (Figura 48 D).

Na análise dos teores de  $\text{N-NO}_3^-$  na bainha e na lâmina foliar, é possível identificar que houve tendência bastante semelhante entre esses compartimentos (Fig.

48 A e B). Na bainha, apesar de bastante elevados, os valores permaneceram relativamente constantes nas duas maiores doses aplicadas. Já no tratamento controle, durante o período de 14-21 DAC, os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  caíram praticamente a zero (56,1 vs. 2,6  $\mu\text{mol/g MF}$ ). Em seguida, aos 28-35 DAC, uma queda similar foi observada para a dose de 80mg N Kg de solo<sup>-1</sup>. Nas lâminas o comportamento observado foi o mesmo da bainha. Os maiores contrastes foram observados aos 14DAC entre os mesmos tratamentos (160N vs. Controle). A mesma queda observada nas bainhas foi observada também nas folhas, quando aos 28-35DAC, o tratamento de 80mg N kg solo<sup>-1</sup> registrou queda de 708%.

Vale ressaltar que os valores observados para  $\text{N-NO}_3^-$  não oferecem risco aos animais, já que os registros encontrados no Brasil remontam a valores superiores a 2000 ppm (mg/kg) de  $\text{N-NO}_3^-$  nas folhas aveia e azevém (JÖNCK, 2010). De fato, não foram encontrados registros de literatura, com a descrição de ocorrência de acumulação de  $\text{N-NO}_3^-$  nos tecidos do capim Tifton 85, que pudessem representar riscos à saúde animal.



**Figura 48.** Variação temporal nos teores de N-nitrato no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  observações. n.d.= não determinado.

O colmo, juntamente com as bainhas, apresentou os maiores acúmulos de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 48 A e C), podendo ser considerados como locais preferenciais de armazenamento de  $\text{N-NO}_3^-$  no capim Tifton 85. No colmo, é possível observar a mesma tendência registrada para as porções foliares, onde apesar de tardia e menos intensa,

ocorre o esgotamento total dos teores de nitrato no tratamento controle aos 28 DAC, possivelmente devido a um muito baixo influxo radicular. Nesta mesma data inicia a redução do tratamento de 80 N, que aos 35 DAC registra seu menor valor (Fig. 48 C).

Nas raízes, embora não se disponham dos dados relativos aos 14 e 21 DAC, é possível inferir uma tendência acentuada de queda no tratamento que recebeu 80 mg N kg solo<sup>-1</sup>, o qual caiu a zero por ocasião da amostragem final (Figura 48 D). Para os níveis maiores de aplicação, o teor de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> registrou um pico aos 28 DAC, com teores de ≈ 40 μmol de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g MF<sup>-1</sup> na dose de 160 mg N kg solo<sup>-1</sup>. Na amostragem seguinte (35 DAC) é possível observar que para todos os tratamentos que receberam N suplementar houve redução nos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sendo que no tratamento 80 mg N kg solo<sup>-1</sup> a redução foi total. De forma geral, redução dos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> poderiam refletir a sua maior remobilização e assimilação de pelo sistema NR, conforme já observado em outras espécies (FONTES et al., 2008; SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2011; APRIGIO et al., 2012).

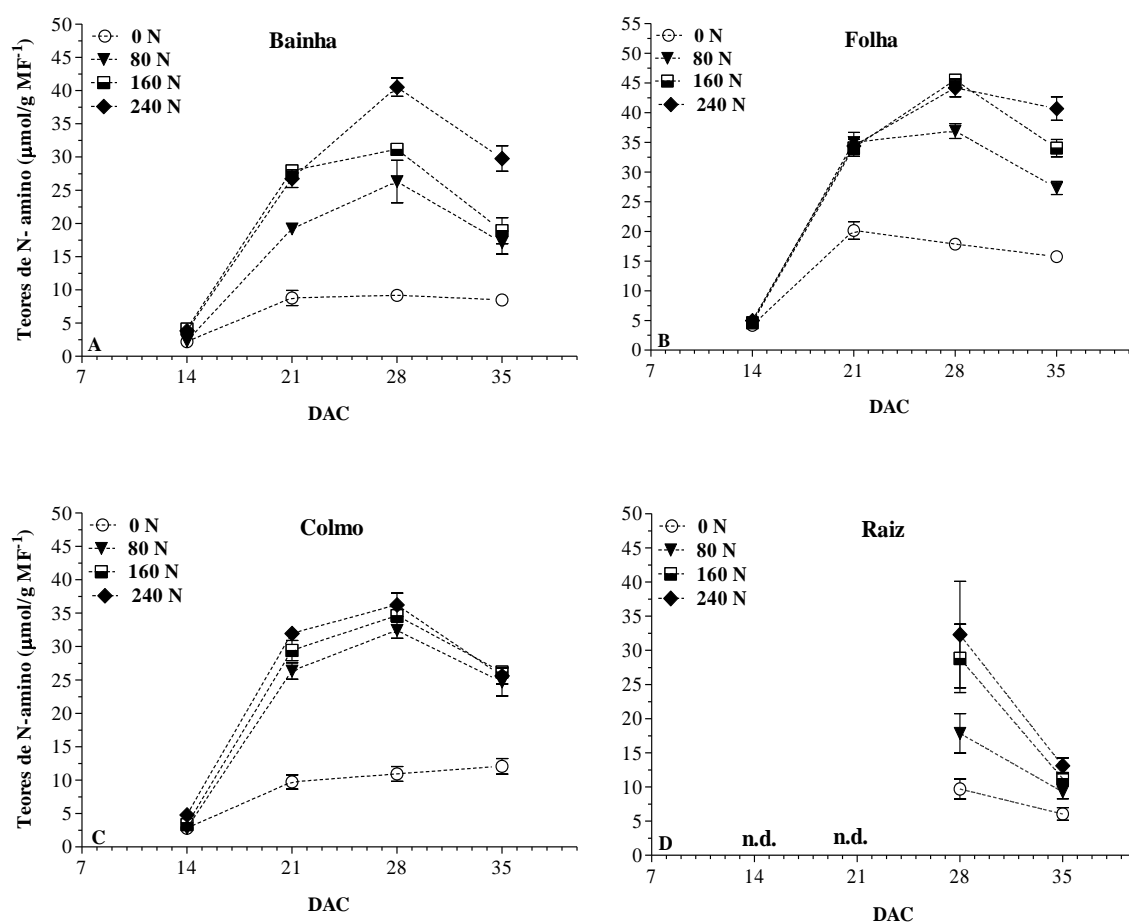
Em relação aos teores de N-amino livre na bainha, a análise de variância (teste F) indicou efeitos significativos para dose de N, DAC e para a interação entre dose x DAC (p<0,0001). Nas lâminas, os teores de N-amino livre revelaram efeitos significativos para dose de N, DAC e para a interação entre dose x DAC (p<0,0001). Essa mesma ordem de significância das fontes de variação, ocorreu em colmos e raízes.

Numa apreciação geral, as maiores concentrações de N-amino livre foram observadas nas folhas, bainha, colmo e raiz, em ordem decrescente. Os teores de N-amino observados neste segundo experimento, em folhas e bainhas, nas maiores doses aplicadas, excederam largamente os valores observados em solução nutritiva que se situaram, em termos médios, entre 26-30 μmol g MF<sup>-1</sup>, nivelando-se entre as dose 5-10 mM (Figuras 33 A e B).

Na figura 49 é apresentada a variação nos teores de N-amino livre nas diferentes partes do capim Tifton 85, em função de DAC. Nos colmos, bainhas e folhas dos tratamentos que receberam N, houve um mesmo padrão de progressivo aumento temporal, a taxas decrescentes, até os 28 DAC, nos quais se verificam os maiores contrastes, principalmente considerando os níveis de N-amino no tratamento não adubado. Uma semana depois (35 DAC), os teores caíram, em todas as partes vegetativas, com diferentes intensidades em concordância com a redução da massa seca total nesse período. As menores reduções foram observadas para as folhas. Já na bainha foliar, e principalmente nas raízes, a intensidade de queda chegou a 68% em relação aos valores registrados aos 28 DAC (Figura 49 A e D), sinalizando possível repasse de N-amino em direção às folhas, mesmo num quadro desfavorável ao metabolismo nitrogenado. Nos estudos realizados com arroz, uma espécie anual, com metabolismo C<sub>3</sub>, Fernandes (1990) comunicou correlações negativas, entre matéria fresca vs. amino-N (r= 0,89), matéria fresca vs. amônio (r= 0,67) e N-amino vs. amônio (r= 0,95), levantando a hipótese de que sob condições de acúmulo excessivo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nos tecidos, aminoácidos e/ou amidas poderiam vir a ser deaminados e os esqueletos de carbono daí resultantes usados como substrato para a manutenção do metabolismo das plantas. Pelo até aqui discutido com relação ao comportamento do Tifton 85, é evidente que a sua forma de lidar com possíveis excessos na oferta de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disponível na solução do solo, é diferente da do arroz, mesmo sendo esta última espécie tida como tolerante à nutrição amoniacal. Todavia, presumivelmente altos níveis de N-amino em raízes e parte aérea no Tifton (Figuras 49 B e D), podem ter outras implicações em termos de absorção e metabolismo de N neste cultivar. Pesquisas têm mostrado que o “pool” interno de aminoácidos, e particularmente glutamato, pode fornecer um sinal regulatório dos influxos de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em plantas (MILLER et al., 2007). Aparentemente, a fonte



para tal tipo de regulação “feedback” seria o “pool” de N-amino locado no floema, embora outras alternativas tenham sido sugeridas (LEA & MIFLIN, 2011). Também, existe demonstração experimental de que o aumento do influxo de  $\text{NH}_4^+$  pode decrescer o influxo, ou aumentar o efluxo, de  $\text{NO}_3^-$  (MILLER & CRAMER, 2004). Se esses mecanismos regulatórios, em alguma medida, estivessem operando no presente sistema experimental, isto poderia conduzir à minimização da influência da absorção de nitrato a partir da fonte mista utilizada neste experimento. As condições metabólicas para tal existem, mas é difícil, com os dados disponíveis, poder discernir entre as várias alternativas. Por outro lado, como a nitrato redutase tem a sua síntese e atividade induzidas pelo substrato, é previsível que, em situações onde os influxos de  $\text{NO}_3^-$  para o citosol sejam baixos, a ANR será igualmente baixa.



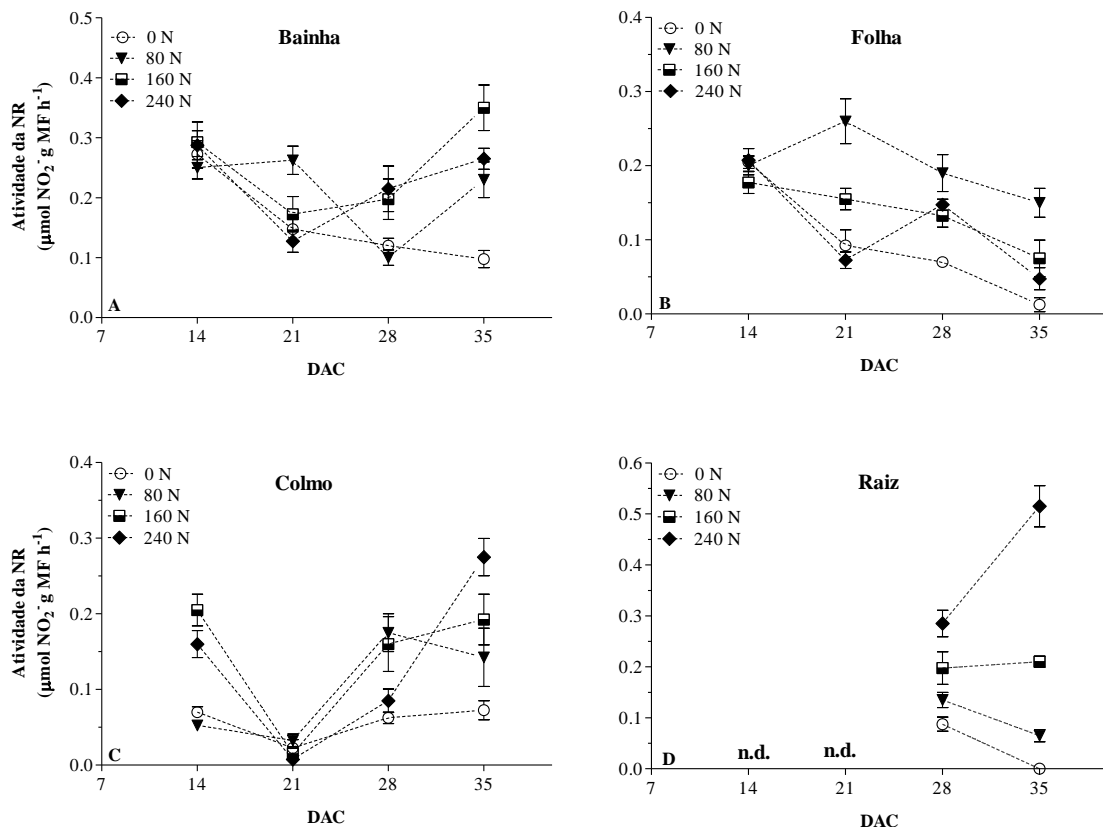
**Figura 49.** Variação temporal nos teores de N-amino no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  observações. n.d.= não determinado.

Em relação à atividade da enzima nitrato redutase (ANR) na bainha, nas lâminas foliares e nos colmos, a análise de variância (teste F) indicou os mesmos efeitos significativos para os três compartimentos: dose de N, DAC e dose x DAC, ( $p < 0,0001$ ).

A variação temporal da ANR em função das doses de N aplicadas, é apresentada na figura 50 (A-D). Nas raízes, a ANR apresentou o maior valor entre os componentes morfológicos, mas apenas na maior dose estudada, atingindo um valor modesto ( $0,5 \mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), apenas aos 35 DAC, e na maior dose de N aplicada (Figura 50 D),

justamente a que induziu queda na matéria fresca total (Figuras 37-39). Infelizmente, outras inferências ficaram prejudicadas pela falta de dados amostrais aos 14 e 21 DAC. Para uma comparação, todos os valores de ANR obtidos ficaram sempre abaixo de  $0,6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , valor considerado baixo em folhas e bainhas de *Brachiaria decumbens*, em resposta à aplicação de até  $80 \text{mg N kg}^{-1}$  solo (FERNANDES & FREIRE, 1976).

Esses resultados, que reiteram tendências já observadas no cultivo hidropônico, coloca a questão dos baixos níveis de ANR encontrados no Tifton 85, mesmo com os altos níveis de adubação nitrogenada aqui empregados. Em conexão com este tema, Ruan et al. (2007) comentaram, a partir de observações feitas com outras espécies vegetais, que baixas taxas de crescimento usando nutrição nítrica, em comparação à nutrição amoniacal, poderiam ser produto, ou de baixas taxas de absorção de  $\text{NO}_3^-$  ou de uma assimilação ineficiente, devido a uma baixa ANR, ou ainda, a uma combinação desses fatores. No que diz respeito às raízes, baixa ANR não em traço inerente, dado que, a níveis bem menores de N externo, e talvez, numa combinação ambiental mais favorável, obtiveram-se atividades da ordem de  $3,0\text{-}5,0 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Figura 35). Essa observação, aliada aos resultados outros aqui obtidos (Fig. 50) permitiriam pensar sim em algum tipo de inibição específica sobre os influxos de nitrato, que a presença crescente do cátion  $\text{NH}_4^+$  no meio de absorção, não ajuda a mitigar. Justificam-se, portanto, estudos adicionais direcionados a examinar, mais precisamente, quais as razões dessa aparente baixa ANR no capim Tifton 85.

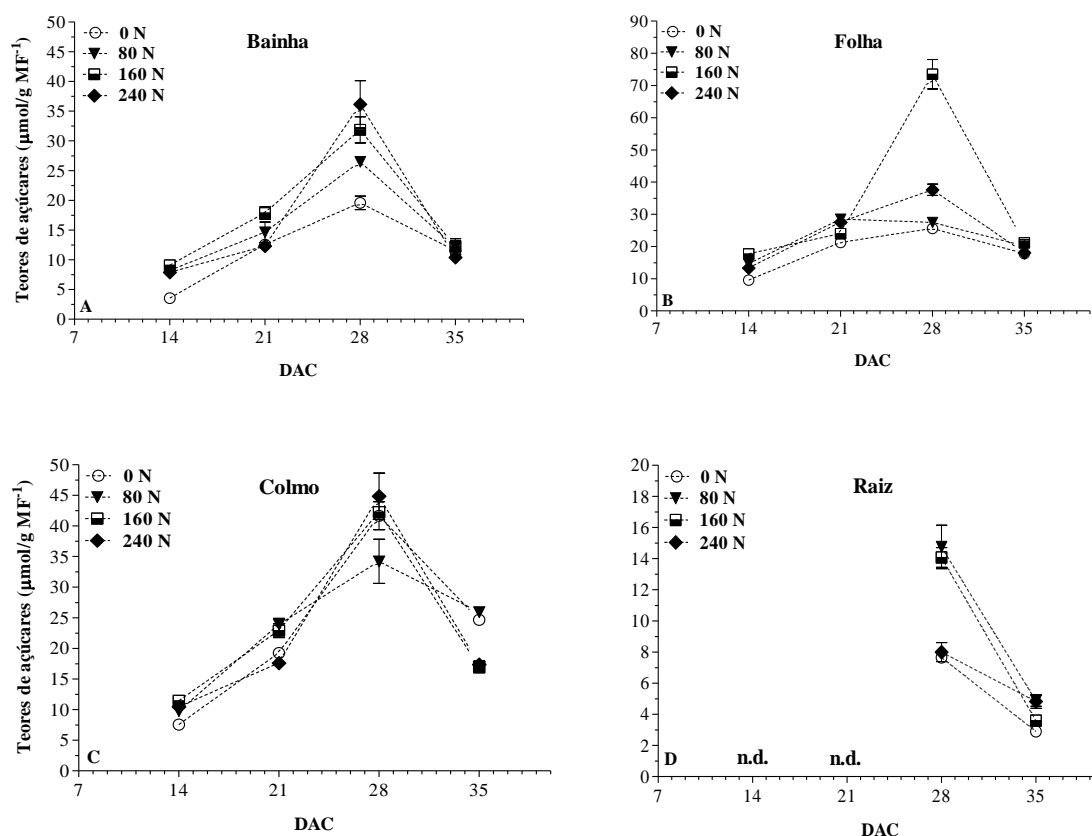


**Figura 50.** Variação temporal da atividade da enzima nitrato redutase no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  observações. n.d.= não determinado.

#### 4.2.5 Açúcares solúveis

Em relação aos teores de açúcares solúveis (AS) na bainha e lâmina foliar, a análise de variância indicou efeitos significativos para dose de N, DAC e para a interação entre dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Nos colmos, houve significância para épocas de coleta (DAC) e para a interação entre dose x DAC ( $p < 0,0001$ ). Nas raízes, os teores de AS foram significativos para dose de N, DAC e para a interação entre dose x DAC ( $p < 0,0001$ ).

Na figura 51 são apresentadas as variações temporais para os teores de AS na bainha, lâmina foliar, colmos e raízes do capim Tifton 85.



**Figura 51.** Variação temporal dos teores de açúcares solúveis no capim Tifton 85, cultivado em casa de vegetação, em função de doses de nitrato de amônio. A) bainha foliar; B) lâmina foliar; C) colmo e D) raiz. Barra vertical indica erro padrão de  $n=4$  observações. n.d.= não determinado.

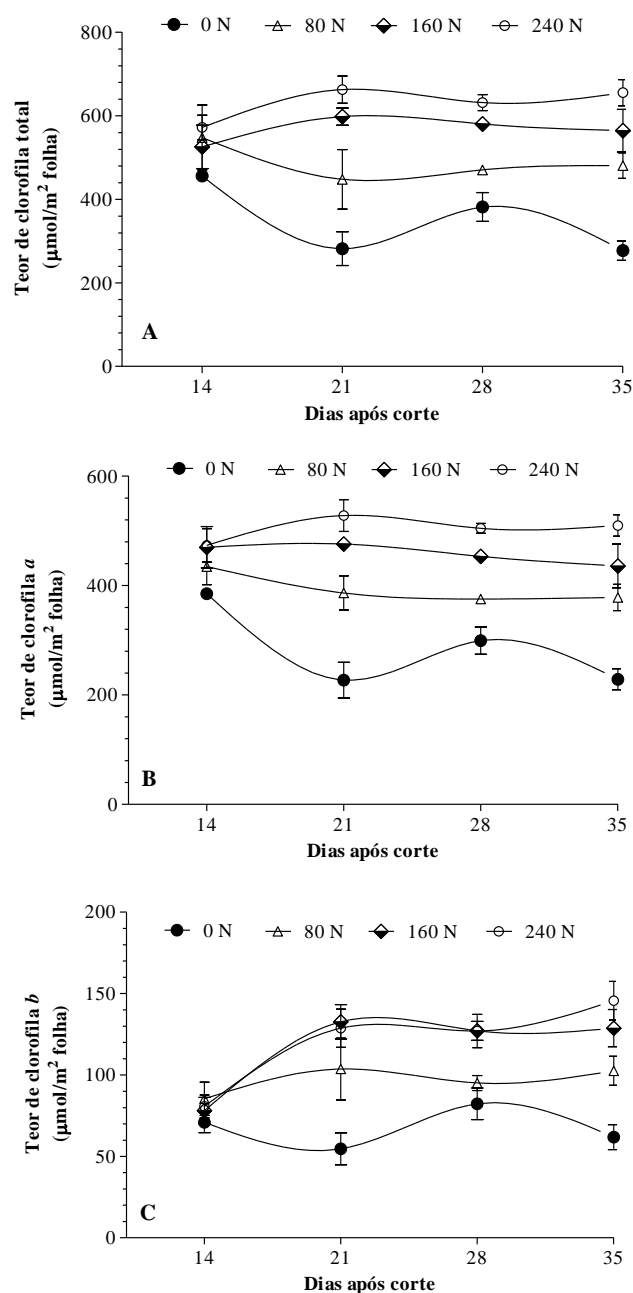
Em todas as partes avaliadas do capim Tifton 85 foi observado que aos 28 DAC foram alcançados os maiores valores médios. Em ordem decrescente de acúmulo é possível registrar a seguinte ordem: colmos, folhas, bainhas e raízes.

Na porção da bainha foi possível registrar aos 28 DAC, contrastes de até 84% entre os tratamentos, devidos a picos de acúmulo, associados às duas maiores doses de aplicação (Figura 51 A). Significativo também na lâmina foliar aos 28 DAC, o pico de acumulação isolado, na lâmina foliar, correspondente ao tratamento  $160\text{mg N kg solo}^{-1}$  (Figura 51 B). Esse tratamento foi o que maximizou a produção de massa fresca ou seca, (Figuras 39 e 41), além do que, aos 28 DAC, manteve as raízes supridas com um estoque razoável de AS (Figura 51D), forneceu energia para a absorção de  $\text{NH}_4^+$  (Figura

47 D) e redução de nitrato (Figura 49 D), maximizou a síntese de aminoácidos nelas (Figura 48 D) e ainda acumulou reservas no colmo (Figura 51 C). Esse comportamento metabólico é similar ao verificado quando as plantas foram submetidas a nutrição puramente amoniacal em solução nutritiva (Experimento 1). Isto deixa dúvidas sobre se realmente os alegados benefícios de uma nutrição mista (50%  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ ) (MILLER & CRAMER, 2004; LOPES & ARAUS, 2008; ZHOU et al, 2011) são deveras atuantes em Tifton 85, em termos de melhoria da eficiência de assimilação do N. Claro está que também não nega essa possibilidade, de maneira que, no limite, pode-se concluir que uma nutrição 100% amoniacal, ou 50%  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ , resultaram superiores, em termos de eficiência assimilatória de N, do que uma nutrição 100% nítrica.

#### 4.2.7 Teores de clorofila extraída

Para os teores de clorofila total (CFT) (N N Dimetilformamida, MORAN, 1982), a análise de variância detectou efeitos significativos para dose de N ( $p < 0,0001$ ) e para a interação dose x DAC ( $p = 0,0256$ ). Na primeira amostragem, aos 14 DAC, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Já aos 21 DAC, as duas maiores doses de N, diferiram, como grupo, das duas inferiores. Nesta mesma data foram observados os maiores teores CFT, que chegaram a  $745 \mu\text{mol m}^{-2}$  para a maior dose. Também nessa data foram observados os maiores contrastes ( $281$  vs.  $662 \mu\text{mol m}^{-2}$ , respectivamente (Figura 52A). Aos 28 DAC, as diferenças foram minimizadas em virtude de um aumento nos teores de CFT na testemunha. A partir daí, houve estabilização nos tratamentos que receberam N e uma queda acentuada nos teores de clorofila total do tratamento testemunha, evidenciando uma deficiência no influxo radicular de N mineral, já detectada com outros indicadores metabólicos. Dados semelhantes foram observados por Barbieri Junior (2009) a campo, quando também observou os maiores teores de clorofila aos 24 DAC. Os resultados obtidos por Barbieri Junior et al. (2010) para parcelas do capim Tifton 85 adubadas com  $450 \text{kg de N-uréia ha}^{-1}$  estão contidos no intervalo aqui produzido pelas doses de nitrato de amônio aplicadas. Daughtry et al. (2000) também observaram que os teores de clorofila total mais do que duplicaram com o aumento das doses de fertilizante nitrogenado aplicadas sobre plantas de milho. Outros autores têm feito observações qualitativamente similares em outras espécies vegetais (SHADCHINA & DMITRIEVA, 1995; GUIMARÃES et al., 1999; ARGENTA et al., 2001 a e b; HARIPRIYA ANAND & BYJU, 2008).



**Figura 52.** Variação temporal dos teores de clorofila extraída de discos foliares, obtidos de folhas do Tifton 85, em função de quatro níveis de adubação nitrogenada. **A)** Clorofila total; **B)** Clorofila *a*; **C)** Clorofila *b*. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

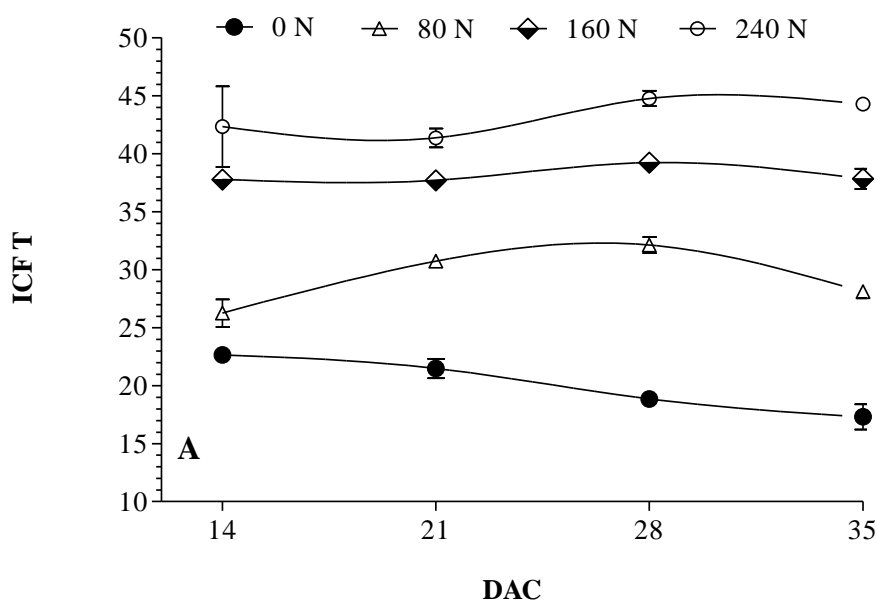
Para a clorofila *a* observou-se a mesma tendência de resultados do que para a CFT, com significância para doses de N ( $p < 0,0001$ ); DAC ( $p = 0,0370$ ) e para a interação entre esses fatores ( $p = 0,0112$ ). Na primeira amostragem também não houve diferença significativa, sendo esta observada na avaliação seguinte, (21 DAC) ocasião em que foram observados os maiores teores de clorofila *a* e o maior contraste entre os tratamentos, com valores médios de 227 vs. 527  $\mu\text{mol m}^{-2}$  folha, para o controle e a

maior dose, respectivamente (Figura 52 B). Nas demais coletas, o comportamento continuou bastante semelhante ao observado com clorofila total.

Com relação aos teores de clorofila *b*, os mesmos foram influenciados pelas doses de N ( $p < 0,0001$ ); DAC ( $p = 0,0002$ ) corte e pela interação dose x DAC ( $p = 0,0132$  anexos). Em nenhuma das coletas foi observada diferença entre os valores de clorofila *b* entre os tratamentos das duas maiores doses, sugerindo provável saturação em relação às doses adotadas para esse período de avaliação (Figura 52 C).

#### 4.2.8 Determinação com clorofilômetro (ICF T)

Para as leituras com clorofilômetro, a análise estatística revelou efeitos significativos de nível de N ( $p < 0,0001$ ) e da interação dose de NxDAC ( $p = 0,0015$ ). Aos 14DAC, só foi observado contraste significativo entre dois grupos, formados pelos tratamentos das duas doses superiores vs. tratamentos das duas doses inferiores (80 e 0mg de N kg solo<sup>-1</sup>). Em todas as datas seguintes, houve diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ) para todos os tratamentos (Figura 53).



**Figura 53.** Variação temporal de leituras do clorofilômetro (ICF) para o teor de clorofila total (A) em folhas do Tifton 85, após corte de uniformização, para quatro doses de adubação nitrogenada. As curvas conectando os pontos foram geradas pelo procedimento de análise gráfico “Cubic spline”. Barra vertical indica o desvio padrão da média.

Os maiores contrastes entre as leituras foram observados aos 35 dias, correspondendo a valores de  $44,3 \pm 0,4$  e  $17,3 \pm 2,1$  unidades ICF T entre a maior dose 240mg N kg solo<sup>-1</sup> e o tratamento controle.

De acordo com a figura 53 observa-se uma relativa estabilidade das leituras, independentemente das variações que existiram quando as clorofilas foram extraídas com DMF (Figura 52). Assim, o clorofilômetro não capturou a exata dinâmica temporal da CFT no tratamento testemunha, assim como subestimou o valor para o tratamento 80mg N kg solo<sup>-1</sup>, aos 14DAC, e mostrou uma tendência quadrática crescente de

resposta para esse tratamento, que não existiu quando da extração direta (Figuras 53 vs. 52A).

Todavia, existe outro aspecto de maior interesse em relação ao presente trabalho. Como foi descrito nos itens 4.2.1 e 4.2.2, as produções de massa fresca ou seca sofreram redução significativa com aplicação de 240mg N kg solo<sup>-1</sup> após atingir um máximo com dose em torno de 150mg N kg solo<sup>-1</sup>. Todavia, tanto a extração direta das clorofilas quanto a sua estimativa indireta (ICF) mostraram que a maior dose aplicada produziu consistentemente, durante todo o ciclo de rebrota, mais clorofila por unidade de área foliar (em média, 15% a mais), do que o tratamento 160mg N kg solo<sup>-1</sup> (Figura 53).

De acordo com Zhang et al. (2008), a utilização de clorofilômetro como um instrumento de diagnose das necessidades nutricionais do vegetal, está baseada no suposto de que doses supra-ótimas de N não afetem as leituras do aparelho, sendo que aumentos nos teores de CFT não acompanhados por aumentos na produção de matéria seca, caracterizariam uma situação de “produção de luxo” de clorofila. Esse tipo de resultado confirma observação prévia de Silva et al. (2011), os quais avaliaram o comportamento das clorofilas e da biomassa seca, durante tres ciclos de rebrota, em Seropédica, RJ. Nesse experimento, foi verificado que, num dos ciclos estudados, os valores de ICF T aumentaram de acordo com as maiores doses de aplicadas, enquanto a matéria seca da parte aérea não variou significativamente nessas mesmas doses. O padrão de resposta no presente caso é algo diferente, posto que o “a produção de luxo” de clorofila foi acompanhada de diminuição absoluta da matéria seca produzida. Todavia, o que transparece é que os excessos de N absorvidos são canalizados, em parte, à síntese de mais clorofila pelas folhas, numa situação desfavorável, onde possivelmente um excesso de auto sombreamento esteja deprimindo a fotossíntese, e portanto a eficiência de uso da radiação solar (SILVA et al., 2011).

## 5 CONCLUSÕES

A proposta central do presente trabalho consistiu na avaliação dos mecanismos de assimilação de N por parte do capim Tifton 85, na presença das duas formas mais comuns de ocorrência do N mineral nos solos: como cátion  $\text{NH}_4^+$ , ou sob a sua forma oxidada, como anion  $\text{NO}_3^-$ . Como ponto de partida, formulou-se a hipótese de que a nutrição nítrica, de forma exclusiva, deveria conduzir a uma maior eficiência de assimilação de N, em relação à nutrição amoniacal exclusiva.

Quando ambas as alternativas nutricionais foram confrontadas sob condições ambientais rigidamente controladas e a disponibilidade nutricional otimizada através de cultivo hidropônico, o conjunto de indicadores obtidos levou à rejeição da hipótese inicial. O capim Tifton 85 respondeu à nutrição amoniacal, em confronto com a nutrição nítrica, com maior produção de massa fresca e massa seca total, maior fração alocação fracional da biomassa total nas raízes, maior teor de clorofila total e maiores teores de açúcares solúveis e aminoácidos em folhas e raízes.

Numa segunda instância, foi pesquisado o comportamento assimilatório do capim Tifton 85 perante uma nutrição mista (50%  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ ), em experimento conduzido com solo em condições de casa de vegetação. Neste caso, o comportamento metabólico do tratamento maximizou à produção de biomassa e reproduziu traços similares aos verificados sob nutrição puramente amoniacal, incluindo maior produção de clorofila, e alocação preferencial de açúcares solúveis e aminoácidos em raízes e colmos. Tal comportamento negou a suposição inicial de que uma nutrição mista deveria aumentar a eficiência assimilatória em relação à utilização exclusiva de nutrição amoniacal ou nítrica. Foi concluído que uma nutrição 100% amoniacal, ou 50%  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ , foram superiores, em termos de eficiência assimilatória de N, do que uma nutrição 100% nítrica.

Em relação á demanda por novos estudos, a presente pesquisa identificou as seguintes áreas de interesse:

*i)* Estudos sobre respostas fotossintéticas do capim Tifton á nutrição nítrica ou amoniacal, pura ou em diversas combinações. Além das taxas assimilatórias de carbono seriam de interesse estudos sobre condutância estomática e mecanismos de eficiência fotoquímica;

*ii)* Estudos visando esclarecer o potencial efetivo de redução de nitrato nos diversos tecidos e órgãos, com especial referencia às raízes, identificadas como o principal compartimento assimilatório no Tifton 85;

*iii)* Estudos que procurem um maior detalhamento sobre quais os transportadores de nitrato e amônio atuantes nas raízes do Tifton, incluindo os mecanismos de expressão ou repressão gênica;

*iv)* No contexto dos mecanismos assimilatórios, é necessário complementar os presentes estudos com prospecções a nível metabólico e molecular, relativas ao efetivo papel as enzimas glutamato-sintase (GOGAT), glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH).



## 6 REFERÊNCIAS

- ADESE, B.; CARVALHO, C.A.B.; SANTOS, R.C.; LEMOS, V.S.; MENDES, M.R.F.; POLIDORO, J.C.; ZANINE, A.M.; ALMEIDA, F.Q.; ROSSIELLO, R.O.P.; OLIVEIRA, D.A.B. Efeitos de doses de nitrogênio sobre a dinâmica de perfilhamento do capim-coastcross (*Cynodon dactylon* L. Pers cv. coastcross-1). In: 41 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, Campo Grande. Anais, 2004. v. CD ROM.
- ALEXANDRINO, E.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; MOSQUIM, P.R. REGAZZII, A. J.; ROCHA, F.C. Características morfogênicas e estruturais na rebrotação de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a três doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p. 1372-1379, 2004.
- ALMEIDA, A.J. Produção de bovinos com suplementação líquida. In: **A produção animal na visão dos brasileiros**, W.R.S. Mattos et al., eds. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 246-252.
- ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F.; VERNEQUE, R.S.; BOTREL, M.A. Resposta do tifton 85 a doses de nitrogênio e intervalos de cortes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.12, p. 2345-2352, 1999.
- ANDERSON, D.S.; TEYKER, R.J.; RAYBURN, A.L. Nitrogen form effects on early root morphological and anatomical development. **Journal of Plant Nutrition**, v.14, n.11, p. 1255-1266, 1991.
- ANDREWS, M.; RAVEN, J.A.; LEA, P.J.; SPRENT, J.I. A role for shoot protein in shoot-root dry matter allocation in higher plants. **Annals of Botany**, v.97, n.1, p. 3-10, 2006.
- APRIGIO, A.; REZENDE, R.; FREITAS, P.S.L; COSTA, A.R.; SOUZA, R.S. Teor de nitrato em alface hidropônica em função de vazões e períodos de pós-colheita. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, v.16, n.9, p. 946-951, 2012.
- ARAÚJO, J.S.; ANDRADE, A.P.; RAMALHO, C.I.; AZEVEDO, C.A.V. Cultivo do pimentão em condições protegidas sob diferentes doses de nitrogênio via fertirrigação. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, v.13, n.5, p. 559-565, 2009.
- ARGENTA, G.; DA SILVA, P.R. F.; BORTOLINI, C.G. Clorofila na folha como indicador do nível de nitrogênio em cereais. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p. 715-722, 2001a.
- ARGENTA, G.; DA SILVA, P.R. F.; BORTOLINI, C.G.; FORSTHOFER, E.L.; STRIEDER, M.L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n.2, p. 158-167, 2001b.
- ARRUDA, M.L.R.; FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Alumínio e nitrogênio, nas variações do pH e capacidade de troca catiônica em *Brachiaria decumbens*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.18, n.9, p. 1031-1036, 1983.

BARBIERI JUNIOR, É. **Características estruturais, teores de clorofila e suas relações com o nitrogênio foliar e a biomassa em capim Tifton-85**. Dissertação de Mestrado. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009. 49p.

BARBIERI JUNIOR, É.; ROSSIELLO, R.O.P.; MORENZ, M.J. F.; RIBEIRO, R.C. Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85, **Ciência Rural**, v. 40, n.3, p. 633-636, 2010.

BARBIERI JUNIOR, É.; ROSSIELLO, R.O.P.; SILVA, R.V.M.M.; RIBEIRO, R.C.; MORENZ, M.J.F. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tifton 85. **Ciência Rural**, v.42, n.12, p.2242-2245, 2012.

BELLOW, F.E. Nitrogen metabolism and crop productivity. In: PESSARAKLI, M (Ed.). **Handbook of plant and crop physiology**. New York: Marcel Dekker Inc. p. 275-301. 1995.

BELTRANO, J.; RONCO, M.G.; BARREIRO, R.; MONTALDI, E.R. Plant architecture of *Paspalum virginatum* Schwartz modified by nitrate and ammonium nutrition. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n.7, p. 1159-1166, 1999.

BENDIX, M.E.S.; FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Aspectos de la nutrición nitrogenada de *Paspalum notatum* Flügge, en respuesta a fuentes de nitrógeno e inhibición de nitrificación. **Turrialba**, v.32, n.1, p. 33-41, 1982.

BORGES, E.A.; FERNANDES, M. S.; LOSS, A.; SILVA, E.E.; SOUZA, S.R. Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. **Caatinga**, Mossoró, v.19, n.3, p. 278-286, 2006.

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

BRITTO, D.T.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y. Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ . An evaluation of recent proposals. **Journal Plant Physiology**, v.125, n.2 , p. 523-526, 2001a.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. **Journal Plant Physiology**, v.159, n.6 , p. 567-584, 2002.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Plant nitrogen transport and its regulation in changing soil environments. **Journal of Crop Improvement**, v.15, n.2, p. 1-23, 2005.

BRITTO, D.T; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. Futile transmembrane  $\text{NH}_4^+$  cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.98, n.7, p. 4255-4258, 2001b.

CABRAL, W.B.; SOUZA, A.L.; ALEXANDRINO, E.; TORAL, F.L.B.; BONELLI, E.A.; LIMA, L.R. Morphogenetic traits and biomass accumulation of *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés subjected to nitrogen doses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.8, p.1809-1815, 2012.

- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.
- CANTARUTTI, R.B.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; COSTA, O.V. **Impacto do animal sobre o solo**: compactação e reciclagem de nutrientes. In: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 826-837.
- CARMO-SILVA, A.E.; POWERS, A.S.; KEYS, A.J.; ARRABAÇA, M.C.; PARRY, M.A.J. Photorespiration in C<sub>4</sub> grasses remains slow under drought conditions. **Plant, Cell & Environment**. v.31, n.7, p. 925-940, 2008.
- CATALDO, D.; MARRON, M.; SCHRADERA, L.E.; YOUNGSA, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, n.1, p. 853-855, 1975.
- CAZETTA, J.O.; VILLELA, L.C.V. Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). **Scientia Agricola**, v.61, n.6, p. 640-648, 2004.
- CHIEN, S.H.; PROCHNOW, L.I.; CANTARELLA, H. Recent developments of fertilizer production and use to improve nutrient efficiency and minimize environmental impacts. **Advances in Agronomy**, v.102, p. 267-322, 2009. acesso em 26 setembro. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>.
- CLARKSON, D.T. Root structure and sites of ion uptake. In: WAISEL, Y., ESHEL, A., KAFKAFI, U. (Eds.) **Plant Roots: The Hidden Half**, 2nd edn. New York : Marcel Dekker, Inc., 1996. p. 483- 510.
- CLEMENT, C.R.; HOPPER, M.J.; JONES, L.H.P. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. I. Effect of nitrate concentration. **Journal of Experimental Botany**, v.29, n.2, p. 453-464, 1978.
- CORREA, L.A.; CANTARELLA, H; PRIMAVESI, A.C.; PRIMAVESI, O.; FREITAS, A.R.; DA SILVA, A.G. Efeito de fontes e doses de nitrogênio na produção e qualidade da forragem de capim-coastcross. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p. 763-772, 2007.
- COSTA, K.A.P.; FAQUIN, V.; DE OLIVEIRA, I.P.; RODRIGUES, C.; SEVERIANO, E.C. Doses e fontes de nitrogênio em pastagem de capim-marandu: I - alterações nas características químicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.4, p. 1591-1599, 2008.
- CRAMER, M.D.; LEWIS, O.A.M. The influence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nutrition on the carbon and nitrogen partitioning characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants. **Plant and Soil**, v.154, n.2, p. 289-300, 1993.

CRUZ, J.L.; PELACANI, C.R.; ARAÚJO, W.L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, v.65, n.3, p. 467-475, 2006.

CRUZ, P.; BOVAL, M. Effect of nitrogen on some morphogenetic traits of temperate and tropical perennial forage grasses. In: LEMAIRE, G.; HODGSON, J.; MORAES, A. et al. (Eds). **Grassland ecophysiology and grazing ecology**. New York: CABI Publishing, 2000. p.151-168.

DAUGHTRY, C.S.T.; WALTHALL, C.L.; KIM, M.S.; COLSTOUN, E.B.; MCMURTREY, J.E. Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. **Remote Sensing of Environment**, v. 74, n.2, p. 229-239, 2000.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction. **Anal. Chem.**, v. 49, n.7, p. 1080-1080, 1977.

FERNANDES, M. S. Efeitos de Fontes e Níveis de Nitrogênio Sobre A Absorção e Assimilação de N em Arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, n.1, p. 1-6, 1990.

FERNANDES, M. S. Interação entre N-amoniaco e energia ambiente na nutrição nitrogenada do arroz. ANAIS DO XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, p. 229-233, 1976.

FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. 1.ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. v.1. 432 p.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Aspectos do metabolismo e utilização do nitrogênio em gramíneas tropicais. In: MATTOS, H.B.; WERNER, J.C; YAMADA, T.; MALAVOLTA, E. (Eds.). **Calagem e adubação de pastagens**. Piracicaba, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 93-123.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P.; BENDIX, M.E.S. Effects of N-source, light intensity and temperature on nitrogen metabolism of bahiagrass. **Journal of Plant Nutrition**, v.8, n.10, p. 945-963, 1985.

FERNANDES, M.S.; FREIRE, L.R. Efeitos do nitrogênio nítrico aplicado ao solo na atividade da nitrato-redutase e na acumulação de N-solúvel em *Brachiaria* sp. **Turrialba**, v.26, n.3, p. 268-273, 1976.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Review of Plant Sciences**, v.14, n.2, p. 111-148, 1995.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Uso de  $\text{NH}_4^+$  e de um inibidor de nitrificação na adubação do milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, n.2, p. 263-268, 1979.

FERREIRA, A.C.B.; ARAÚJO, G.A.A.; PEREIRA, P.R.G.; CARDOSO, A.A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p. 131-138, 2001.

FOYER, C.H.; PARRY, M.; NOCTOR, G. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.382, p. 585-593, 2003.

FOYER, C.H.; ZHANG, H. (Eds.) **Nitrogen metabolism in plants in the Post-Genomic Era**. Oxford: Blackwell Publishing ltd., 2011. 384 p.

GALZERANO, L.; ROSSIELLO, R.O.P; OLIVEIRA, A.P.P. ; PACIULLO, D.S.C.; MORENZ, M.J.F.; SILVA, R.P. Mudanças em atributos estruturais de dosséis do capim-Tifton 85 na fase de estabelecimento, induzidas pela adubação nitrogenada. **Boletim de Indústria Animal**, v.65, n.4, p. 329-336, 2008.

GARCEZ NETO, A.F.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; REGAZZI, A.J.; FONSECA, D.M.; 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**, v.31, n.5, p. 1890-1900, 2002.

GARRIDO, R.G. **Absorção e Assimilação de Amônio em duas Variedades de Arroz: Integração entre o Metabolismo de Nitrogênio e Carbono**. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

GASTAL, F.; BÉLANGER, G.; LEMAIRE, G. A model of the leaf extension rate of tall fescue in response to nitrogen and temperature. **Annals of Botany**, London, v.70, n.2, p. 437-442, 1992.

GASTAL, F.; LEMAIRE, G. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p. 789-799, 2002.

GIVAN, V.V. Metabolic detoxification of ammonia in higher plants. **Phytochemistry**, v. 18, n.3, p. 375-382, 1979.

GLASS, A.D.M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, n.5, p. 453-470, 2003.

GLASS, A.D.M.; BRITTO, D.T.; KAISER, B.N.; KINGHORN, J.R.; KRONZUCKER, H.J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M.Y.; UNKLES, S.E.; VIDMAR, J.J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p. 855-864, 2002.

GOMIDE, C.A.M.; PACIULLO, D.S.C.; COSTA, I.A.; LIMA, A.M.; CASTRO, C.R.T.; LÉDO, F.J.S. Morphogenesis of dwarf elephant grass clones in response to intensity and frequency of defoliation in dry and rainy seasons. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7, p. 1445-1451, 2011.

GOMIDE, J.A.; QUEIROZ, D.S. Valor alimentício das brachiárias. In: Simpósio sobre Manejo de Pastagens, 16, Piracicaba, 1994. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p. 223-248, 1994.

GUIMARÃES, T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ V.V.H.; MONNERAT, P.H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivados em dois tipos de solo. **Bragantia**, v. 58, n.1, p. 209-216, 1999.

HARIPRIYA ANAND, M.; BYJU, G. Chlorophyll meter and leaf colour chart to estimate chlorophyll content, leaf colour, and yield of cassava. **Photosynthetica**, v.46, n.4, p. 511-516, 2008.

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

HOJJATI, S.M.; TAYLOR, T.H.; TEMPLETON, W.C. Nitrate accumulation in rye, tall fescue and bermudagrass as affected by nitrogen fertilization. **Agronomy Journal**, v.64, n.5, p. 624-627, 1972.

HOLZSCHUH, M.J.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I.; MEURER, E.J.; CARMONA, F.C.; VALADÃO, S.E.; COSTA, G.A. Resposta do arroz irrigado ao suprimento de amônio e nitrato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.5, p. 1323-1331, 2009.

HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley, 1995. 464p.

HUNT, R. **Plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1978 (Studies in Biology, 96). 1978. 67 p.

INSANDE, J.; TOURAINÉ, B. N demand and the regulation of nitrate uptake. **Journal Plant Physiology**, v. 105, n.1, p. 3-7, 1994.

ISHIKAWA, T.; SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; OKADA, K. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. **Plant and Soil**, v.255, n.1, p. 413-419, 2003.

JACKSON, L.E.; BURGER, M.; CAVAGNARO, T.R. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, n.1, p. 341-363, 2008.

JARVIS, S.C.; SCHOLEFIELD, D.; PAIN, B. Nitrogen cycling in grazing systems. In: BACON, P.E. (Ed.). **Nitrogen fertilization in the environment**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 381-419.

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

JIANG, Z.; HULL, R.J.; SULLIVAN, M. W. Nitrate uptake and reduction in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grasses. **Journal of Plant Nutrition**, v.25, n.6, p. 1303-1314, 2002.

JONCK, F. **Intoxicação espontânea e experimental por nitrato/nitrito em bovinos alimentados com *Avena sativa* (aveia) e/ou *Lolium spp.* (azevém)**. 2010, Dissertação

de Mestrado. Departamento de Clínica e Patologia. Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages

KAWACHI, T.; SHOJI, Y.; SUGIMOTO, T.; OJIB, Y.; KLEINHOFSC, A.; WARNERC, R.L.; OHTAKEA, N.; OHYAMAA, T.; SUEYOSHIA, K. Role of xylem sap nitrate in regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.48, n.1, p. 79-85, 2002.

KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; KIRK, G.J.D. Nitrate-ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. **Journal Plant Physiology**, v.119, n.3, p. 1041-1046, 1999.

KUSSOW, W.R.; SOLDAT, D.J.; KREUSER, W.C.; HOULIHAN, S.M. Evidence, regulation, and consequences of nitrogen-driven nutrient demand by turfgrass. **ISRN Agronomy**. v.2012, Article ID 359284, 9 pages doi:10.5402/2012/359284.

LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. In: FOYER, C.H.; ZHANG, H. (Eds.) **Nitrogen metabolism in plants in the Post-Genomic Era**. Oxford: Blackwell Publishing ltd., 2011. p. 1-22.

LEMAIRE, G.; OOSTEROM, V.; JEUFFROY, M.; GASTAL, F.; MASSIGNAM, A. Crop species present different qualitative types of response to N deficiency during their vegetative growth. **Field Crops Research**, v.105, n.3, p.253-265, 2008.

LOBO, A.K.M.; MARTINS, M.O.; NETO, M.C.L.; BONIFÁCIO, A.; SILVEIRA, J.A.G. Compostos nitrogenados e carboidratos em sorgo submetido à salinidade e combinação de nitrato e amônio. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p. 390-397, 2011.

LOGAN, K.A.B.; THOMAS, R.J.; RAVEN, J.A. Hydrogen ion production and ammonium uptake by two tropical forage grasses. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, n.1, p. 53-66, 1999.

LOPES, M.S.; ARAUS, J.L. Comparative genomic and physiological analysis of nutrient response to  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_3^-$  in barley seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.134, n.1, p.134-150, 2008.

LUISI, N.V.V.; ROSSIELLO, R.O.P.; FERNANDES, M.S. Acidificação do rizocilindro de milho em resposta à absorção de nutrientes e sua relação com o crescimento radicular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, n.1, p. 69-74, 1983.

MACDUFF, J.H.; BAKKEN, K. Diurnal variation in uptake and xylem contents of inorganic and assimilated N under continuous and interrupted N supply to *Phleum pratense* and *Festuca pratensis*. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n. 381, p. 331-344, 2003.

MAGALHAES, J.R.; HUBER, D.M. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. **Fertilizer Research**, v.21, n.1, p.1-6, 1989.

- MAGIERO, J.Q. **Estratégias de manejo da adubação nitrogenada e potássica em uma pastagem de *Brachiaria humindicola*, estabelecida em Planossolo da Baixada Fluminense, durante a estação chuvosa.** Seropédica: UFRRJ, 2004. 73p. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia).
- MANTOVANI, A. A method to improve leaf succulence quantification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, n.1, p. 9-14. 1999.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** San Diego: Academic Press, 1995. 889p.
- MARTHA JUNIOR, G.B.; CORSI, M.; TRIVELIN, P.C.O.; VILELA, L.; PINTO, T.L.F.; TEIXEIRA, G.M.; MANZONI, C.S.; BARIONI, L.G. Perda de amônia por volatilização em pastagem de capim-tanzânia adubada com uréia no verão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, suppl.3, p. 2240-2247, 2004.
- MARTUSCELLO, J.A.; FONSECA, D.M.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; MOREIRA, L.M. Características morfológicas e estruturais do capim-Xaraés submetido à adubação nitrogenada e desfolhação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p. 1475-1482, 2005.
- MARTUSCELLO, J.A.; FONSECA, D.M.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; SANTOS, P.M.; CUNHA, D.N.F. Características morfológicas e estruturais de capim-massai submetido a adubação nitrogenada e desfolhação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p. 665-671, 2006.
- MEDEIROS, ROSANE M.T., RIET-CORREA, F.; TABOSA, I.M.; SILVA, Z.A.; BARBOSA, R.C.; MARQUES, A.V.M.S.; NOGUEIRA, F.R.B. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.1, p. 17-20, 2003.
- MEGDA, M.M. **Suprimento de nitrogênio e de potássio e características morfológicas, nutricionais e produtivas do capim-Marandu.** Piracicaba: USP, 2009. 84p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia).
- MEGDA, M.M.; MONTEIRO, F.A. Nitrogen and potassium supply and the morphogenic and productive characteristics of marandu palisadegrass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p. 1666-1675, 2010.
- MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v.274, n.1, p.1-36, 2004.
- MOKHELE, B.; ZHAN, X.; YANG, G.; ZHANG, X. Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors, **Can. J. Plant Sci.**, v.92, n.3, p. 399-405, 2012.
- MOTULSKY, H.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting.** Oxford: Oxford University Press, 2003. 352p.



NERES, M.A.; CASTAGNARA, D.D.; SILVA, F.B.; DE OLIVEIRA, P.S.R.; MESQUITA, E.E.; BERNARDI, T.C.; GUARIANTI, A.J.; VOGT, A.S.L. Características produtivas, estruturais e bromatológicas dos capins Tifton 85 e Piaã e do feijão-guandu cv. Super N, em cultivo singular ou em associação. **Ciencia Rural**, v.42, n.5, p. 862-869, 2012.

NORMAN, J.M.; ARKEBAUER, T.J. Predicting canopy light-use efficiency from leaf characteristics. In: HANKS, J., RITCHIE, J.T. **Modeling plant and soil systems**. Madison: American Society of Agronomy, 1991. p.125-144.

NÄSHOLM, T.; KIELLAND, K.; GANETEG, U. Uptake of organic nitrogen by plants. **New Phytologist**, v.182, n.1, p. 31-48, 2009.

OLIVEIRA, A.B.; PIRES, A.J.V.; NETO, U.M.; 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**, v.36, n.4, p. 1006-1013, 2007.

OLIVEIRA, A.P.P. **Crescimento e composição químico-bromatológica do capim Tifton 85 (*Cynodon spp*) sob doses de nitrogênio**. Seropédica: UFRRJ, 2008. 77p. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia).

OLIVEIRA, A.P.P.; ROSSIELLO, R.O.P.; GALZERANO, L.; J.B.G.; COSTA JÚNIOR; SILVA, R.P.; MORENZ, M.J.F. Respostas do capim-Tifton 85 à aplicação de nitrogênio: cobertura do solo, índice de área foliar e interceptação da radiação solar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p. 429-438, 2010.

OLIVEIRA, M. A. J.; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; RODRIGUES, J. D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 515-522, 2005.

OLIVEIRA, O.C. **Parâmetros químicos e biológicos relacionados com a degradação de pastagens de *Brachiaria ssp.* no cerrado brasileiro**. Seropédica, UFRRJ, 2000, 230p.

PAIVA, A.J.; DA SILVA, S.C.; PEREIRA, L.E.T.; GUARDA, V.D.A.; PEREIRA, P.M.; CAMINHA, F.O. Structural characteristics of tiller age categories of continuously stocked marandu palisade grass swards fertilized with nitrogen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.1, p. 24-29, 2012.

PEARSE, P.J.; WILMAN, D. Effects of applied nitrogen on grass leaf initiation, development and death in field swards. **Journal of Agricultural Science**, v.103, n.2, p. 405-413, 1984.

PELLNY, T.K.; VAN AKEN, O.; DUTILLEUL, C.; TONJA WOLFF, T.; GROTEN, K.; BOR, M.; DE PAEPE, R.; REYSS, A.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. **The Plant Journal**, v.54, n.6, p. 976–992, 2008.

PEREIRA, O.G. ROVETTA, R.; RIBEIRO, K.G.; SANTOS, M.E.R.; FONSECA, D.M.; CECON, P.R. Crescimento do capim-tifton 85 sob doses de nitrogênio e alturas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.1, p. 30-35, 2012.

PITMAN, M.G. Uptake and transport of ions in barley seedlings. III. Correlation between transport to the shoot and relative growth rate. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, n.5, p. 905-919, 1972.

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

PREMAZZI, L.M.; MONTEIRO, F.A.; CORRENTE, J.E. Tillering of Tifton 85 bermudagrass in response to nitrogen rates and time of application after cutting. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.60, n.3, p. 565-571, 2003.

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 Zootecnia**, v.40, n.3, p. 518-526, 2011.

PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A.C.; CÔRREA, L.A.; SILVA, A.G.; CANTARELLA, H. Lixiviação de nitrato em pastagens de coastcross adubada com nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.53, n.3, p. 683-690, 2006.

QUARESMA, J.P.S.; ALMEIDA, R.G.; ABREU, J.G.; CABRAL, L.S.; OLIVEIRA, M.A.; CARVALHO, D.M.G. Produção e composição bromatológica do capim-tifton 85 (*Cynodon spp.*) submetido a doses de nitrogênio. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.33, n.2, p.145-150, 2011.

RADIN, J.W.; PARKER, L.L.; SELL, O.S. Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots. **Plant Physiology**, v.62, n.4, p. 550-553, 1978.

RADOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C. & HINCHCLIFF K.W. 2000. **Veterinary Medicine**. 9<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders, London. 1881p.

RAO, K.P.; RAINS, W. Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics. **Plant Physiology**, v.57, n.1, p. 55-58, 1976.

RECK, R.A.; HOAG, K.J. A comparison of greenhouse gas mitigation options. **Energy**, v.22, n.2-3, p. 115-120, 1997.

RIBEIRO, R.C.; CARVALHO, M.G.; LOPES, H.M.; ROSSIELLO, R.O.P.; BARBIERI JÚNIOR, E. Allelopathic activity of the hydrolate and water decoction of *Brachiaria humidicola* (Rendle) plant parts on the germination of four tropical leguminous species. **ISRN Agronomy**, vol. 2012, Article ID 838767, 6 pages, 2012.

RICHARDSON, A.D.; DUGAN, S. P.; BERLYN, G. P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, v.153, n.1, p. 185-194, 2002.

ROBSON, M.J.; DEACON, M.J. Nitrogen deficiency in small closed communities of S24 ryegrass. II. Changes in the weight and chemical composition of single leaves during their growth and death. **Annals of Botany**, v.42, n.5, p.1199-1213, 1978.

ROSSIELLO, R.O.P.; ANTUNES, M.A.H. Solar radiation utilization by tropical forage grasses: light interception and use efficiency. In: BABATUNDE, E.B. (Ed.) **Solar radiation**. Rijeka, Croatia: In Tech Open Access, 2012. p. 221-244. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/solar-radiation/solar-radiation-utilization-by-tropical-forage-grasses-light-interception-and-use-efficiency>.

ROSSIELLO, R.O.P.; MAGIERO, J.Q.; ALVES, B.J.R.; et al. Ampla predominância de N-amônio sobre N-nitrato em Planossolo da Baixada Fluminense, RJ, sob pastagem de *Brachiaria humidicola*. In: 44a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: Unesp/SBZ, 2007. v. CD ROM.

ROSSIELLO, R.O.P.; FERNANDES, M.S.; FLORES, J.P.O. Efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e a acumulação de carboidratos solúveis em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, n.4, p. 561-566, 1981.

RUAN, J.; GERENDÁS, J.; HÄRDER, R.; SATTELMACHER, B. Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of Tea (*Camellia sinensis*) plants. **Annals of Botany**, v. 99, n.2, p. 301–310, 2007.

RUSSELLE, M.P. Nitrogen cycling in pastures and range. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.5, n.1, p. 13-23, 1992.

SAHRAWAT, K.; KEENEY, D.R. Effects of nitrification inhibitors on chemical composition of plants. A review. **Journal of plant nutrition**, v.7, n.9, p.1251-1288, 1984.

SANTOS, A.M; BUCHER, C.A.; STARK, E.M.L.; FERNANDES, M. S.; SOUZA S. R. Efeito da Disponibilidade de Nitrato em Solução Nutritiva Sobre a Absorção de Nitrogênio e Atividade Enzimática de Duas Cultivares de Arroz. **Bragantia**, São Paulo, v.68, n.1, p.215-220, 2009.

SANTOS, H.G.; JACOMINE, P.H.T.; ANJOS, L.H.C.; OLIVEIRA, V.A.; COELHO, M.R.; LUMBRERAS, J.F.; CUNHA, T.J.F. (Ed). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa-Solos, 2006. 306p.

SAS Institute, **Statistical Analysis System SAS/STAT Software version 9.0**, SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002.

SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E.D.; CABOCHE, M; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **The Plant Journal**, v.11, n.4, p.671–691, 1997.

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

SCHJOERRING, J.K.; HUSTED, S.; MÄCK, G.; MATTSSON, M. The regulation of ammonium translocation in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.883-890, 2002.

SCHRADER, L.E.; DOMSKA, D.; JUNG, P.E.; PETERSON, L.A. Uptake and assimilation of ammonium-N and nitrate-N and their influence on the growth of corn (*Zea mays* L.). **Agronomy Journal**, v.64, n.5, p. 690-695, 1972.

SHADCHINA, T.M.; DMITRIEVA, V.V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, n.7, p. 1427-1437, 1995.

SHAN, A.Y.K.V.; OLIVEIRA, L.E.M.; BONOME, L.T.S.; MESQUITA, A.C.. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.6, p. 754-762, 2012.

SILVA, C.A.; VALE, F.R. Disponibilidade de nitrato em solos brasileiros sob efeito da calagem e de fontes de nitrogênio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.12, p. 2461-2471, 2000.

SILVA, R.V.M.M. **Composição químico bromatológica do capim Tifton 85 e sua relação com os teores de clorofila**. Dissertação de Mestrado. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009. 41p.

SILVA, R.V.M.M.; ROSSIELLO, R.P.; MORENZ, M.J.F. BARBIERI JUNIOR, E.; GOMES, R.L.T.; CAMARGO FILHO, S.T. Uso de clorofilometro na avaliação da adubação nitrogenada e potássica no capim Tifton 85. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.3, p. 828-839, 2011.

SILVEIRA, M.L.; HABY, V.A.; LEONARD, A.T. Response of Coastal Bermudagrass yield and nutrient uptake efficiency to nitrogen sources. **Agronomy Journal**, v. 99, n.3, p. 707-714, 2007.

SIQUEIRA NETO, M.; PICCOLO, M.C.; COSTA JUNIOR, C.; CERRI, C.C.; BERNOUX, M. Emissão de gases do efeito estufa em diferentes usos da terra no bioma Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.1, p. 63-76, 2011.

SILVEIRA, J. S. M.; SANT'ANNA, R. Efeitos de nitrato e do amônio no crescimento e fracionamento do N em capim-colonião. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, n.2, p. 135-143, 1988.

SMIRNOFF, N.; STEWART, G.R. Nitrate assimilation and translocation y higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 64, n.2, p. 133-140, 1985.

SOARES, A.B., RESTLE, J., FILHO, D.C.A., SOUZA, F.C. Resposta econômica da Pastagem de Triticale mais azevém, submetida a néveis de adubação nitrogenada. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35. Botucatu. Anais...Botucatu:SBZ, 1998, p.318-320.

SOUSA, B.M.L.; VILELA, H.H.; SANTOS, M.E.R.; RODRIGUES, C.S.; SANTOS, A.L.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; ASSIS, C.Z.; ROCHA, G.O. Characterization of tillers in deferred Piatã palisade grass with different initial heights and nitrogen levels. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.41, n.7, p. 1618-1624, 2012.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. (Ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215- 252.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, A.T.; Ishikawa, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibitor in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.106, n.41, p. 17302-17307, 2009.

SUBBARAO, G.V.; NAM, N. H.; CHAUHAN, Y. S.; JOHANSEN, C. Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water stress. **Journal of Plant Physiology**, v.157, n.6, p. 651-659, 2000.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TOURAINÉ, B.; CLARKSON, D.T.; MULLER, B. Regulation of nitrate uptake at the whole plant level. In: Roy J, Garnier E, eds. **A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions**. The Hague: SPB Academic Publishing, 1994. p. 11-30.

VIDMAR, J.J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M.Y.; SCHJOERRING, J.K.; TOURAINÉ, B.; GLASS, A. D.M. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. **Plant Physiology**, v.123, n.1, p. 307-318, 2000.

WESTWOOD, J.H.; FOY, C.L. Influence of nitrogen on germination and early development of broomrape (*Orobanche* spp.). **Weed Science**, v.47, n.1, p. 2-7, 1999.

WHITEHEAD, D.C. Grassland nitrogen. Wallingford: CAB International, 1995. 397 p.

WILKINSON, S.; BACON, M.A.; DAVIES, W.J. Nitrate signalling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.7, p.1705-1716, 2007.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v.63, n.1, p. 153-182, 2012.

YEMM, E.W. & COCKING, E.C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Anal. Biochem.**, v.80, n.1, p. 209-214, 1955.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n.3, p. 508-514, 1954.

ZHANG, J.; BLACKMER, A.M.; ELLSWORTH, J.W.; KYVERYGA, P.M.; BLACKMER, T.M. Luxury production of leaf chlorophyll in mid-season recovery from nitrogen deficiencies in corn. **Agronomy Journal**, v.100, n.3, p. 658-664, 2008.

ZHANG, X-K.; RENGEL, Z. Role of soil pH, Ca supply and banded P fertilizers in modulating ammonia toxicity to wheat. **Australian Journal of Agriculture Research**, v.51, n.6, p. 691-699, 2000.

ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X.; CUI, J.; XIA, X.; SHI, K.; YU, J. Effects of nitrogen form on growth, CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. **Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine and Biotechnology)**, v.12, n.2, p. 126-134, 2011.

ZHU, SD.; LU, ZQ.; CHEN, LF.; YU, W.; ZHANG, SJ. Effect of temperature and food on *Spodoptera litura* population. **Chinese Journal of Applied Ecology**, v.11, n.1, p.111-114, 2000.