

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO EM
MILHO CULTIVADO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO
E POTÁSSIO

Sueli Maria da Silva

Química

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Junho de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO EM
MILHO CULTIVADO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO
E POTÁSSIO

Sueli Maria da Silva

Orientador: Prof. Dr. Samuel Mariano Gison da Silva
Co - Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás – UFG, Campus Jataí, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JATAÍ – GOIÁS – BRASIL

Junho de 2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/CAJ/UFG)

S586a Silva, Sueli Maria da
Atividade de enzima redutase do nitrato em milho cultivado
sob diferentes níveis de nitrogênio e potássio / Sueli Maria da
Silva. – 2009.
43 f.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Mariano Gilson da Silva.
Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Campus Jataí, 2009

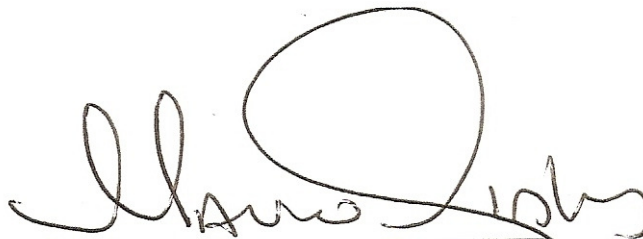
Bibliografia: f. 28-35.
Inclui anexo.

1. Milho – Cultivo 2. Enzima redutase do nitrato - Efeito
3. Nitrogênio 4. Potássio I. Silva, Samuel Mariano Gilson da.
II. Universidade Federal de Goiás. **Campus Jataí.** III. Título.
CDU: 636.15


SUELI MARIA DA SILVA

TÍTULO: “ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO EM MILHO CULTIVADO SOB DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO E POTÁSSIO”

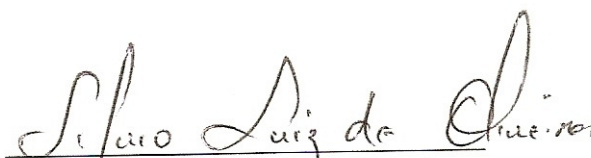
Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 17 de junho de 2009, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof. Dr. Samuel Mariano Gislon da Silva
Presidente – CAJ/UFG



Prof. Dr. Alan Carlos Costa
Membro Externo – IFET/RV



Prof. Dr. -Silvio Luis de Oliveira
Membro – CAJ/UFG

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SUELI MARIA DA SILVA - filha de Montevilson José da Silva e Maria Aparecida da Silva, nascida em Angra dos Reis (RJ), em 21 de fevereiro de 1981. Conclui o primeiro grau no Colégio Estadual de São Simão, na cidade de São Simão (GO), em 1996 e o ensino médio no Colégio Estadual Israel Pinheiro na cidade de Ituiutaba (MG), em 1999. Em março de 2000, ingressou na Universidade Estadual de Minas Gerais, graduando-se em Licenciatura em Química em 2003.

Ingressou no Mestrado em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal, em Março de 2007, na Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí , obtendo o título de “ Mestre” em Junho de 2009.

**Aquele que habita no esconderijo do altíssimo, à sombra do onipotente
descansará.**

Salmos 91: 1

Aos meus amados pais, Maria Aparecida e Montevilson
Aos meus queridos irmãos, Simone, Sirlene e Júnior.

Incansáveis na dedicação,
Imprescindíveis no apoio.

Ao meu namorado Deibes Patrique,

Pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e incentivo às minhas
conquistas.

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades colocadas em minha vida.

À minha família pelo apoio, incentivo, dedicação, amor e respeito sempre.

À Universidade Federal de Goiás – Campus Jataí, especialmente ao Departamento de Agronomia, pela oportunidade concedida para a realização o curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Samuel Mariano Gislon da Silva pela confiança e oportunidade de crescer profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro pela valiosa orientação nas questões agronômicas.

Ao Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis pela preciosa ajuda com as análises estatísticas.

À minha amiga Rosmany Aires, o primeiro incentivo para cursar a pós-graduação, mudou minha vida.

Aos alunos de Agronomia e estagiários do Laboratório de Solos Marcelo Baiano, Marcelo, Luis Henrique, Roberson, Sávio e Rogério que gentilmente colaboraram na etapa de montagem do experimento em casa de vegetação.

Aos estagiários do Laboratório de Bioquímica Anali Martim, Kelly Anne Carmo, Juliana, Emiliane, Maísa Mantelli e Michely Helrigel pelo companheirismo durante todas as fases do experimento.

Aos pós-graduandos Lucielle Januário e Francys Pimenta pela amizade e excelente parceria.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
SUMMARY	v
1 INTRODUÇÃO	06
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	08
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÃO.....	28
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
7 ANEXO.....	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de nitrogênio e potássio.....19
- Figura 2:** Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de nitrogênio quando foi fornecido 40 kg ha⁻¹ de potássio.....21
- Figura 3:** Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de potássio quando foi fornecido 100 kg ha⁻¹ de nitrogênio23
- Figura 4:** Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de nitrogênio quando foi fornecido 160 kg ha⁻¹ de potássio.....25

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** A atividade da enzima nitrato do redutase em função das doses de nitrogênio e potássio na cultura do milho.....17
- Tabela 2:** Análise de variância da atividade da enzima redutase do nitrato em milho cultivado sob diferentes níveis de nitrogênio e potássio.....18

SILVA, Sueli Maria da. **Atividade da enzima redutase do nitrato em milho cultivado sob diferentes níveis de nitrogênio e potássio**. Jataí: UFG, 2008
(Dissertação – Mestrado – Agronomia – Produção Vegetal)

RESUMO - O milho, em função de seu uso na alimentação humana e animal, e de um elevado potencial produtivo, constitui-se num dos mais importantes cereais cultivados e comercializados no mundo. No entanto, para altas produtividades é necessário o suprimento de nutrientes em adequada proporção. O nitrogênio e o potássio são os nutrientes absorvidos em maior proporção, com inúmeras funções nas atividades fisiológicas da cultura. O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito das diferentes doses de potássio e nitrogênio na atividade da enzima redutase do nitrato na cultura de milho em casa de vegetação. Foram utilizadas cinco doses de nitrogênio (0; 50; 100; 150 e 200 kg ha⁻¹) e cinco doses de potássio (0; 40; 80; 120 e 160 kg ha⁻¹). A atividade da enzima foi estimada “*in vivo*” após as plantas atingirem quatro folhas totalmente desdobradas. Utilizou-se o método que se baseia no princípio de que a quantidade de nitrito liberada por fragmentos de tecidos vivos num tampão na presença de uma agente permanente e do substrato, reflete a atividade potencial da enzima. A atividade da enzima nitrato redutase sofreu influência significativa da interação das doses de nitrogênio e potássio, onde a interação N = 100 kg ha⁻¹ e K = 40 kg ha⁻¹ proporcionou as melhores médias do experimento. A partir dessa dose, o aumento no fornecimento tanto de nitrogênio quanto de potássio promoveu redução da atividade enzimática.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Nitrogênio; Potássio; Enzima redutase do nitrato

Activity of the enzyme reductase of the nitrate in corn cultivated under different levels of nitrogen and potassium

SUMMARY:

The corn, in function of its use in the human feeding, animal, and high productive potential, it's considered to be one of the most important cultivated and commercialized cereals in the world. However, for high productivities it is necessary the supply of nutrients in appropriate proportion. The nitrogen and the potassium are the absorbed nutrients in larger proportion, with countless functions in the physiologic activities of the culture. The aim of this work was to value the effect of different potassium doses and nitrogen in the activity of the enzyme reductase of the nitrate in the corn culture in a greenhouse environment. Five dosages of nitrogen (0; 50; 100; 150 and 200 kg ha⁻¹) and five potassium dosages (0; 40; 80; 120 and 160 kg ha⁻¹) were used. The activity of the nitrate reductase was esteemed, "*in vivo*" after the plants reach four leaves totally unfolded. The method that was used is based on the begin the amount of nitrito liberated by fragments of alive tissue in a buffer in a permanent agent's presence and of the substratum, it reflects the potential activity of the enzyme nitrate reductase "*in situ*". The activity of the enzyme nitrate reductase suffered significant influence of the interaction of the dosages of nitrogen and potassium, where the interaction N = 100 kg ha⁻¹ and k = 40 kg ha⁻¹ it provided the medium best of the experiment. From this dosage on, the increase of the of nitrogen as of potassium supplement it caused a reduction of the enzymatic activity.

KEY WORDS: *Zea mays L*; Nitrogen; Potassium; Enzyme redutase of the nitrato

1- INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura de grande e diversificada utilização na sociedade moderna e um dos produtos agrícolas de mais ampla distribuição mundial, tanto na produção, quanto no consumo. Constitui hoje uma das principais espécies de plantas econômicas em cultivo no país.

Para obtenção de altas produtividades é de fundamental importância o suprimento de nutrientes e a adequada proporção entre eles. A disponibilidade do nitrogênio é um dos fatores mais relevantes, pois se apresenta como o nutriente de maior impacto na produção e na qualidade deste cereal.

O nitrogênio é o nutriente absorvido em maiores quantidades pela cultura do milho, com inúmeras funções nas suas atividades fisiológicas. Além do efeito positivo sobre a produção de grãos, interfere em diversas outras características da planta, relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, as quais, direta ou indiretamente, afetam a produtividade da cultura (Melgar et al., 1991).

Após o nitrogênio, o potássio é o nutriente absorvido em maior quantidade pelas plantas. Este nutriente tem grande impacto na qualidade da cultura do milho, exercendo influência positiva sobre o peso individual dos grãos e no número de grãos por espiga. Apesar de não fazer parte de nenhum composto dentro da planta, é muito importante em inúmeros processos bioquímicos (Mengel & Kirkby, 2001).

A via de assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a produtividade final das culturas (Lam et al., 1996). Embora a maior parte do nitrogênio seja absorvida pelas plantas na forma de nitrato, para que possa ser utilizado é necessário que seja reduzido à amônia, e então incorporado em composto orgânico. A conversão do nitrato à amônia é constituída por várias etapas, sendo uma delas a redução do nitrato a nitrito, que é dependente da atividade da enzima redutase do nitrato, e a conversão de nitrito à amônia, pela redutase do nitrito (Meguro & Magalhães, 1987).

A redutase do nitrato é primeira enzima atuante na rota de assimilação e incorporação de nitrogênio inorgânico em moléculas orgânicas complexas,

assumindo, função de extrema importância no metabolismo vegetal, sendo a etapa limitante nesse processo (Donato et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito de doses de nitrogênio e potássio na atividade da enzima redutase do nitrato em plantas de milho em casa de vegetação.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Nitrogênio e potássio na planta

O nitrogênio é o nutriente exigido em maior quantidade pela cultura do milho, sendo o que mais freqüentemente limita a produtividade de grãos. É considerado um dos maiores fatores de produção responsáveis pelo aumento da produtividade (Araújo et al., 2004).

É reconhecida a importância do nitrogênio quanto as suas funções no metabolismo das plantas, participando como constituinte de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, citocromo, clorofila, pigmentos e produtos secundários (Ferreira, et al., 2007). Na planta, quase todo o nitrogênio se encontra na forma orgânica, representadas em maior proporção por aminoácidos e proteínas. Conseqüentemente, é indispensável para a produção de cereais de alta qualidade (Malavolta et al., 1997).

No milho a disponibilidade de nitrogênio, entre outros fatores, é fundamental para a determinação dos seguintes componentes: rendimento de grãos, número de espigas por área, número de grãos por espigas, teor de proteína nos grãos e massa de grãos (Melgar et al., 1991). Além disso, a deficiência de nitrogênio pode comprometer os processos de crescimento e reprodução das plantas (Pottker & Roman, 1998).

É necessário um melhor conhecimento dos processos envolvidos na incorporação e transformação do nitrogênio na planta para que se possa desenvolver estratégias que aumentem sua eficiência de utilização pelas culturas, que no caso do milho, raramente ultrapassa 50% do nitrogênio aplicado (Cantarella & Duarte, 2004).

Dentre os elementos fornecidos pelo solo, o potássio é o segundo macronutriente em teor contido nas plantas, destacando assim, a necessidade de monitoramento desse elemento em várias partes da planta (Viana, 2007).

Para um ótimo crescimento, os teores adequados situam-se entre 2 a 5% do peso seco, dependendo de cada espécie, do estágio de desenvolvimento e do órgão

da planta. O nutriente apresenta alta mobilidade na planta, tanto entre células, como entre tecidos e também entre diferentes partes das plantas, via xilema e floema. É muito comum que o potássio seja redistribuído de folhas velhas para folhas novas (Mengel & Kirby, 1978).

O potássio tem funções reguladoras muito importantes, sendo necessário para ativar pelo menos sessenta enzimas. Está ligado também ao processo fotossintético em vários níveis, participa da síntese do ATP, afeta a taxa de assimilação do dióxido de carbono e a manutenção do turgor das células – guarda (Wendling, 2005).

É importante ainda nos processos que controlam o uso de água pela planta. É o mais importante soluto inorgânico que é osmoticamente ativo, sendo significativo no crescimento e na extensão celular. Plantas adequadamente supridas com potássio têm menor necessidade de água e menor perda de água por causa da reduzida taxa de transpiração, é ação deste nutriente como agente osmótico no mecanismo de abertura e fechamento de estômatos. Isto resulta em maior eficiência de uso da água pela cultura de milho (Büll, 1993).

Na cultura do milho, o potássio apresenta grande impacto na qualidade e produtividade. As respostas do milho ao potássio são caracterizadas em geral, pela precocidade do aparecimento da inflorescência feminina, uniformidade de maturação, maior peso de grãos, resistência do colmo e redução do acamamento. Níveis inadequados de potássio ocasionam espigas palhentas e flexíveis, severo índice de aborto no topo da espiga, resultando em baixas produções e em menor peso de grãos (Büll, 1993).

2.2 - Relação nitrogênio: potássio

A resposta de uma cultura ao potássio depende, em grande parte, do nível em que se encontra a nutrição nitrogenada. Assim, quanto maior o suprimento de nitrogênio, maior o aumento de produtividade devido ao potássio, de modo que a possibilidade de interação desses dois nutrientes é reconhecida há muito tempo (Rosolem, 2005).

Trabalhando com a cultura do milho, Loué (1978) relata que o balanço de doses de nitrogênio e de potássio é importante desde os estádios iniciais de desenvolvimento da cultura. Altos teores de nitrogênio com baixos teores de potássio, por exemplo, favorecem o acamamento. A interação desses nutrientes também influi nos aspectos qualitativos, como conteúdo de proteína, qualidade da silagem e massa de grãos.

Tem sido verificado que o potássio está envolvido na fase final do metabolismo do nitrogênio. Entretanto, Ruan et al., (1998) relatam que o potássio está envolvido no início dos processos metabólicos do nitrogênio, como incorporação do nitrogênio mineral e especialmente na redutase do nitrato.

As interações podem ser responsáveis por significantes mudanças na disponibilidade de nutrientes. Elas podem influenciar a função dos íons e o desenvolvimento fisiológico das plantas. A compreensão destas interações poderia ajudar a melhorar as produções, as recomendações de adubação e a aumentar a eficiência dos fertilizantes. Isto é especialmente importante para aqueles solos que requerem, não só potássio, mas também, nitrogênio, fósforo, magnésio, cálcio, e zinco para se obter produções econômicas máximas das culturas.

2.3 - A assimilação do nitrogênio pelas plantas

Segundo Yamada (1996) o nitrato é a principal forma de nitrogênio absorvido pelas plantas. Ao ser absorvido pelas raízes pode então ser reduzido ou armazenado nos vacúolos, ou translocado para a parte aérea, onde será reduzido ou armazenado nos vacúolos foliares.

A redução do nitrato a nitrito ocorre no citossol catalisado pela enzima redutase do nitrato usando NADH como agente redutor, o nitrito produzido adentra aos plastídeos nas raízes ou cloroplastos em folhas, sendo reduzido a amônia por ação da enzima redutase do nitrito, usando ferredoxina como doador de elétrons (Lea, 1997).

Subsequentemente a amônia é fixada na via glutamato sintase/glutamina sintase (GS/GOGAT) nos aminoácidos, glutamina e glutamato, que por sua vez servem de substrato para reações de transaminação, para a produção de todos os outros aminoácidos necessários à síntese de proteínas (Camargos, 2002).

A assimilação do nitrogênio é um processo dispendioso energeticamente às plantas, razão porque ocorre predominantemente nas folhas centro de síntese de ATP e agentes redutores - fornecedores de elétrons (Netto, 2005). O processo de incorporação do nitrogênio compete com a fotossíntese por massa e energia, consumindo 12 ATPs para cada N assimilado pela planta (Blomm et al., 1992).

A taxa e a quantidade de nitrogênio assimilado pelas plantas durante o seu ciclo dependem da atividade das enzimas envolvidas e da disponibilidade de energia necessária para os processos de assimilação (Bredemeier & Mundstock, 2000).

Nas folhas, a energia para as reações de assimilação do nitrogênio é gerada nos cloroplastos pela fotossíntese, no citosol pela glicólise, e nos mitocôndrios pelo ciclo do ácido tricarboxílico no processo de respiração (Oaks & Hirel, 1985).

2.3.1 - A enzima redutase do nitrato

A enzima redutase do nitrato das plantas superiores é uma flavoproteína formada por duas subunidades idênticas, com três grupos prostéticos: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o grupo heme, um complexo constituído entre o molibdênio (Mo) e uma molécula orgânica denominada pterina, razão porque é, também, denominada uma molibdopterina (Campbell, 1999).

O NADH liga-se ao FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C) até o grupo amino terminal (N). Os elétrons atravessam o grupo heme e chegam ao complexo molibdênio, onde ocorre a redução do nitrato a nitrito.

A seqüência de aminoácidos da cadeia polipeptídica da enzima redutase do nitrato foi identificada mediante a clonagem dessa enzima. Existem, atualmente, mais de 40 seqüências da redutase do nitrato que constitui as formas da enzima das plantas superiores, algas e fungos. A maioria das formas da enzima redutase do nitrato das plantas utiliza o agente redutor NADH produzido no citossol e não o redutor NADPH formado no cloroplasto (Solomonson & Barber, 1990). Entretanto, Crawford et al. (2000) afirmam que algumas formas dessa enzima, com dupla especificidade, podem utilizar tanto o redutor NADPH quanto NADH.

O nitrito produzido pela atividade da redutase do nitrato é tóxico para a célula e para evitar seu acúmulo, a expressão e a atividade da redutase do nitrato são fortemente reguladas por diversos fatores, como a luz, a concentração de nitrato, carboidratos, disponibilidade de cofatores metálicos (Taiz & Zeiger, 2004).

Segundo Buchanan et al. (2001), a atividade da enzima é regulada pela fosforilação e por uma proteína específica conhecida como (14-3-3). A completa inativação ocorre quando a forma fosforilada é associada à proteína (14-3-3). A ativação da nitrato redutase ocorre na dissociação dessa proteína (14-3-3) assim como sua desfosforilação.

Além disso, a quantidade de glutamina livre e sua incorporação em relação ao glutamato disponível são metabólitos que também regulam a capacidade de redução do nitrato na planta (Crawford, 1995). Em condições de baixo teor de glutamina e disponibilidade de nitrato a intensidade da redutase do nitrato e a capacidade de

redução de nitrogênio aumentam, enquanto que quantidades elevadas de glutamina diminuem a redução do nitrato e decresce a atividade da redutase do nitrato (feedback). O equilíbrio da enzima é determinado pela taxa de sua degradação, assim como, pela taxa de síntese da mesma (Netto, 2005). A meia vida de uma proteína recém sintetizada é de poucas horas na célula e quando a quantidade de nitrato diminui o teor da enzima é rapidamente reduzido (Taiz & Zeiger, 2004).

Em condições normais de ativação e na presença de luz a sua ativação seria da ordem de 70% a 90% , reduzindo para 10% a 30% no escuro. A luz não é um sinal direto para atividade, pois mesmo sob intensa e continua luminosidade a redutase do nitrato é inativa quando falta dióxido de carbono, indicando que a fotossíntese é requerida para sua ativação (Kaiser & Huber, 2001). A relação próxima entre regulação da redutase do nitrato e a fotossíntese pode ser importante para evitar o acúmulo de nitrito, uma vez que, a redução do nitrito utiliza a ferredoxina reduzida, um produto da fotossíntese. Uma abrupta parada ou diminuição da fotossíntese poderia gerar acúmulo de nitrito se a atividade da redutase do nitrato não fosse regulada (Lillo et al., 2003). Provavelmente os fotoassimilados exportados para fora dos cloroplastos funcionam como sinalizadores capazes de ativar a redutase do nitrato.

Cada processo é regulado direta ou indiretamente e a capacidade de redução do nitrato é controlada em relação ao nível metabólico total da planta, por sensores e rotas de tradução de sinais (Netto, 2005).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em casa de vegetação e a atividade da enzima redutase do nitrato mensurada no Laboratório de Bioquímica, nas dependências da Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, nos meses de maio e junho de 2008. O híbrido 2B587 – Dow Agrosiences foi escolhido para o trabalho. O delineamento experimental adotado foi em forma de blocos casualizados, em esquema em fatorial 5 x 5, sendo cinco doses de nitrogênio (0; 50; 100; 150 e 200 kg ha⁻¹) e cinco doses de potássio (0; 40; 80; 120 e 160 kg ha⁻¹) com seis repetições.

O solo utilizado no estudo foi um Latossolo Vermelho distroférico, coletado em barranco no próprio Campus, apresentando as seguintes características químicas e físicas: pH em água : 5,18; H + Al: 3,13; Al: 0,05 cmol_c dm⁻³ ; Ca: 0,34 cmol_c dm⁻³; Mg: 0,32 cmol_c dm⁻³; K: 31,00 mg dm⁻³ ; P: 0,72 mg dm⁻³ ; matéria orgânica : 14,23 g kg⁻¹ ; argila: 386 g kg⁻¹ ; silte: 421 g kg⁻¹ e areia : 139 g kg⁻¹ . Depois de peneirado o solo coletado foi seco e homogeneizado, recebendo calagem com calcário filler na proporção de 800 mg kg⁻¹ de solo seco para correção e elevação da saturação de bases para 60% , conforme recomendação de Sousa & Lobato (2004). Após a calagem, este ficou incubado por 20 dias sendo umedecido constantemente.

O solo foi então acondicionado em vasos com capacidade de 5,0 L os quais receberam adubação mineral com fósforo e micronutrientes. O fósforo foi aplicado na dose de 150 kg ha⁻¹ (superfosfato triplo com 41% de P₂O₅).

Os nutrientes nitrogênio forma de uréia (44% de N) e o potássio na forma de cloreto de potássio (KCl com 60% de K₂O) foram aplicados em solução (10ml/vaso) com concentrações de acordo com cada tratamento, um dia antes da semeadura.

Após a aplicação dos nutrientes e das combinações das doses de nitrogênio e de potássio, foi realizada a semeadura utilizando-se cinco sementes por vaso e deixando-se uma planta por vaso após o desbaste.

Somente após as plantas de milho terem atingido o estágio de desenvolvimento V₄ (aproximadamente 18 dias após à emergência), foi realizado o corte da segunda folha após a folha encartuchada.

A atividade da enzima redutase do nitrato foi estimada, " *in vivo*", utilizando - se o método descrito por Klepper et al. (1971), modificado por Meguro & Magalhães (1982), que baseia-se no princípio de que a quantidade de nitrito liberada por fragmentos de tecidos vivos num tampão na presença de uma agente permanente (propanol) e do substrato (nitrato), reflete a atividade potencial da enzima nitrato redutase "*in situ*" (Hageman & Reed, 1980). A atividade da enzima é calculada pela quantidade de nitrito liberado pelos tecidos vegetais na solução de incubação, sendo expressa em $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gmf}^{-1}$.

O material vegetal foi coletado sempre entre 10 e 12 hs, período em que as plantas receberam pelo menos três horas de sol e a redutase do nitrato já tinha atingido sua máxima atividade (Hageman & Reed, 1980).

Após chegarem ao laboratório as folhas foram lavadas com água destilada, secas em papel toalha e em seguida cortadas rapidamente com uma tesoura cirúrgica de modo a obter 0,2 g de amostra de matéria fresca.

Amostras em duplicata dos fragmentos de tecidos foliares foram incubados em frasco de vidro contendo em 5 mL de solução tampão fosfato de potássio ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1M), nitrato de potássio (KNO_3 0,25M) e n-propanol (1% v/v), pH 7,0 submetidos a vácuo durante dois minutos por duas vezes consecutivas e posterior transferência para a incubadora a 33°C em ausência de luz. Após 60 minutos, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL do meio de reação, as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1,0 mL de n-naftiletileno diamino bicloridrato 0,01 % (m/v) e 1,0 mL de sulfanilamida 0,1% em ácido clorídrico 3,0 N, para a determinação colorimétrica do nitrito. Os tubos foram agitados (agitador tipo vortex) e deixados em repouso por 15 minutos para desenvolvimento da cor. As leituras de densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a quantidade de nitrito calculada utilizando-se reta padrão de nitrito de sódio na faixa de 0 a 20 μmoles .

A análise da enzima redutase do nitrato foi realizada nos dias 19,20,21,22 e 23 do mês de junho de 2008, onde as temperaturas médias foram respectivamente: 18,2; 19,2;18,3; 18,8; 19,6 °C.

Os padrões para confecção da reta padrão foram preparados com um dia de antecedência.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, quando significativo ao nível de 5% à regressão, utilizando o pacote estatístico (SAEG – versão 9.0).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para atividade da enzima nitrato redutase e a análise de variância do experimento podem ser observados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: A atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de nitrogênio e potássio na cultura do milho.

Nitrogênio (kg ha ⁻¹)	Potássio (kg ha ⁻¹)	Atividade nitrato redutase (*)
0	0	6,96
0	40	10,01
0	80	8,27
0	120	8,81
0	160	4,77
50	0	6,23
50	40	8,71
50	80	9,47
50	120	8,66
50	160	7,82
100	0	13,46
100	40	17,48
100	80	16,92
100	120	8,48
100	160	9,38
150	0	8,17
150	40	14,58
150	80	10,63
150	120	14,97
150	160	8,47
200	0	17,81
200	40	8,10
200	80	7,96
200	120	13,31
200	160	17,11

(*) Micromoles de nitrito por hora por grama de matéria fresca.

Tabela 2: Análise de variância da atividade da enzima redutase do nitrato em milho cultivado sob diferentes níveis de nitrogênio e potássio.

Fonte	G.L.	SQ	QM	F
N	4	243,396	60,8490	4,749
K	4	14,8222	3,7055	0,289
Bloco	5	75,3414	15,0682	1,176
N x K	16	737,277	46,0798	3,597 *
Resíduo	51	653,406	12,8118	

* 5% de significância pelo teste F

CV = 32.81%

Como pode ser observado na Tabela 1, no estágio de desenvolvimento estudado (V_4), os valores para atividade da enzima redutase do nitrato variaram numa magnitude de 4,7 a 17,8 $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gmf}^{-1}$, corroborando com os resultados obtidos por Majerowicz (2002), que testando a eficiência do uso do nitrogênio em milho aos vinte e um dias após a emergência obteve resultados que variaram de 3,8 a 12,7 $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gmf}^{-1}$.

A análise de variância revelou que a atividade da enzima redutase do nitrato sofreu influência apenas da interação das doses de nitrogênio e potássio e não isoladamente do nitrogênio ou do potássio.

A interação nitrogênio x potássio tem sido bastante estudada, e já é reconhecido seus efeitos benéficos, proporcionando aumentos significativos na produtividade das culturas. Provavelmente, tal se deve ao fato de que o metabolismo do nitrogênio requer adequadas quantidades de potássio no citoplasma (Xu et al., 2002)

Este comportamento também foi observado na atividade da enzima redutase do nitrato, onde a interação $N = 100 \text{ kg ha}^{-1}$ e $K = 40 \text{ kg ha}^{-1}$ proporcionou os melhores resultados. Foi verificado através da equação de regressão que a máxima atividade da enzima redutase do nitrato foi de $18,5 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gmf}^{-1}$ (Figura 1) com o fornecimento da dose 100 kg ha^{-1} de nitrogênio e 40 kg ha^{-1} de potássio.

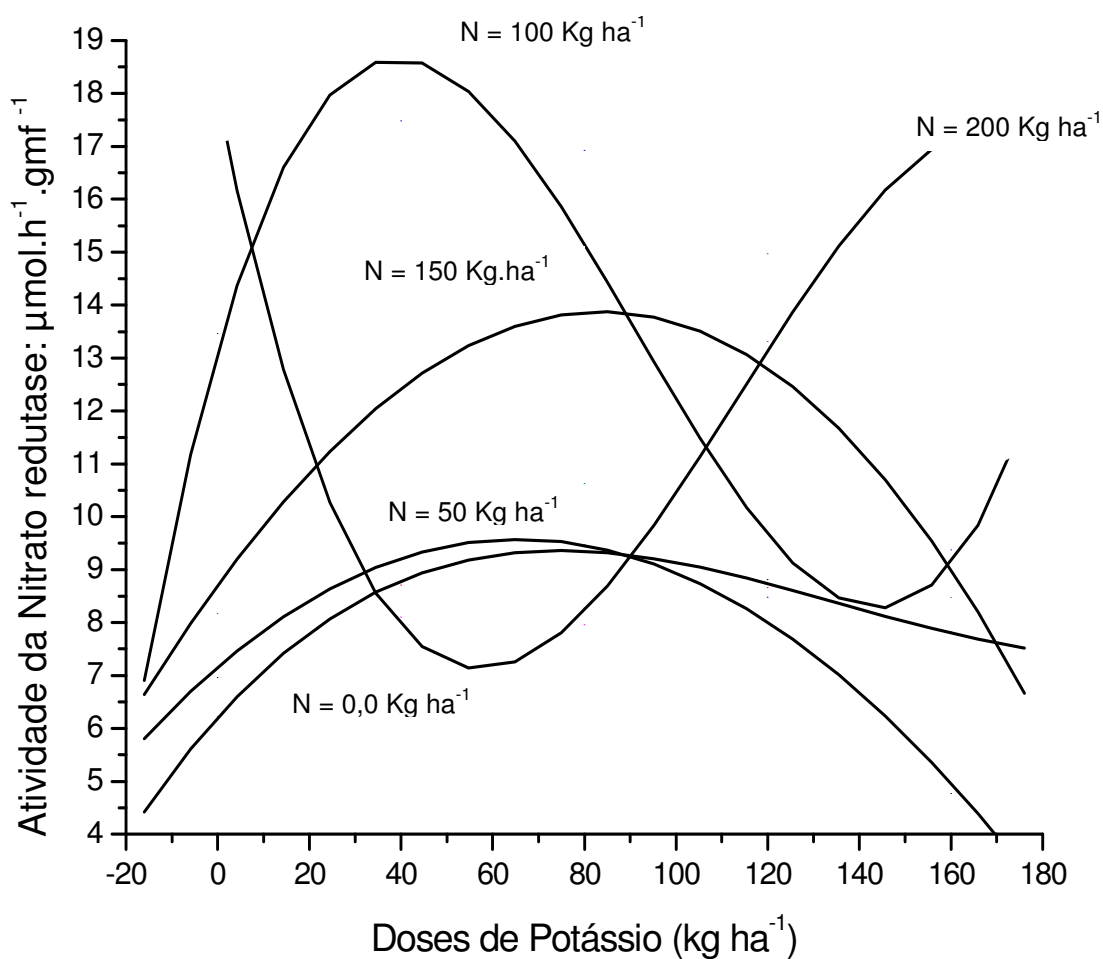


Figura 1: Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de nitrogênio e potássio .

Segundo Lavres-Júnior (2001), a adubação nitrogenada tem, por muitas vezes, apresentado respostas produtivas abaixo das esperadas, em virtude de inadequados níveis de potássio, o que sugere uma relação entre a absorção e o aproveitamento destes dois macronutrientes.

Farinelli et al. (2003) observaram que a cultura de arroz apresentava boa produção sem a aplicação de potássio, mas foi necessária a aplicação de 100 kg ha^{-1} de nitrogênio. Por outro lado quando foi fornecido potássio, mesmo em dose tão baixa como 25 kg ha^{-1} , a dose ótima do fertilizante nitrogenado caiu pela metade em uma clara demonstração da existência de interação.

Na dose de 40 kg ha^{-1} de potássio, à medida que se elevou os teores de nitrogênio, a atividade da enzima redutase do nitrato apresentou uma variação de 10,1 a $17,48 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gmf}^{-1}$ da menor dose até a dose ótima (100 kg ha^{-1}), o que representa um aumento de 74% na atividade enzima redutase do nitrato em virtude dos incrementos da adubação nitrogenada.

Isto sugere que a enzima possa ter sido ativada pelo substrato (Figura 2), uma vez que é considerada como sendo um dos melhores exemplos de enzima induzida pelo substrato em plantas superiores (Camargos, 2007). Estes resultados corroboram com os que foram relatados por Santos (1997) em estudo relativo à diagnose nutricional e às respostas da Braquiária a doses de nitrogênio e enxofre, onde o nitrogênio estimulou a atividade da enzima redutase do nitrato no primeiro crescimento.

$$Y = 9,583 - 0,065x + 0,002x^2 - 9,1 \times 10^{-6} x^3$$

$$R^2 = 80,86\%$$

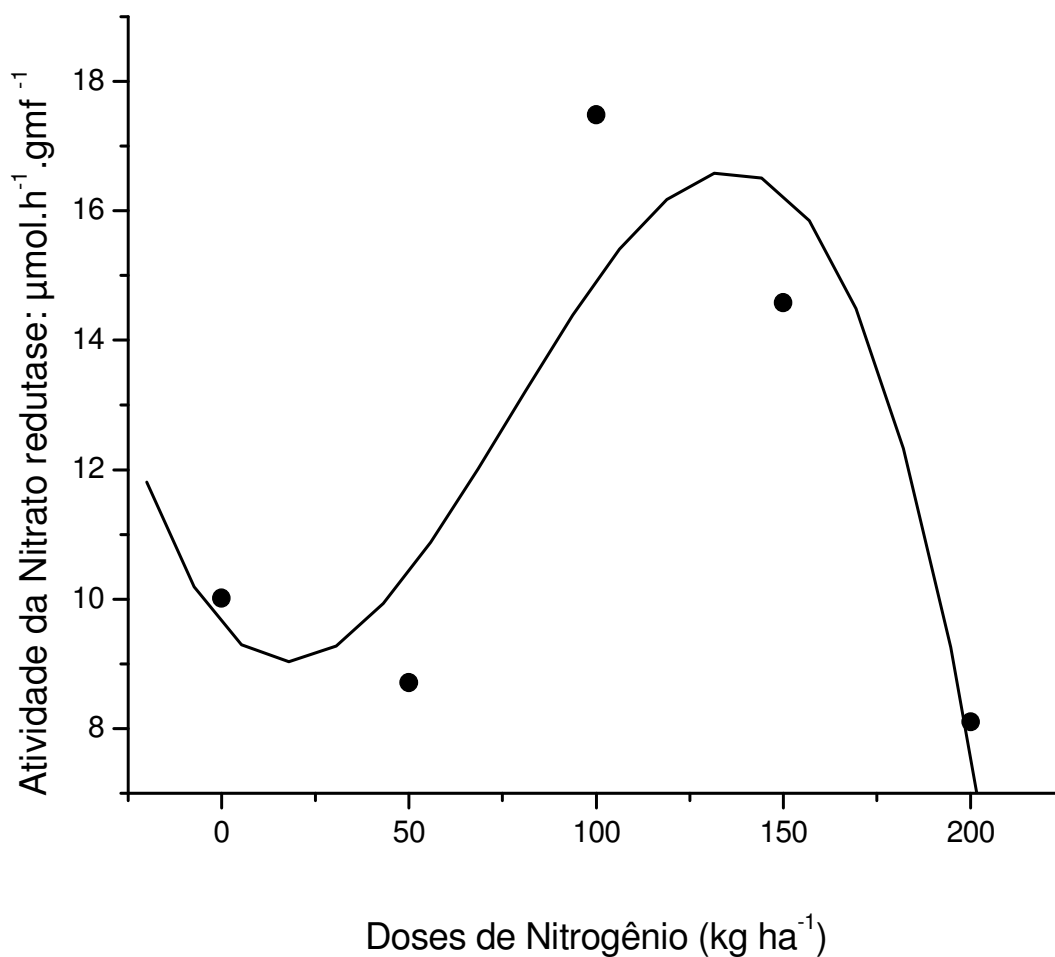


Figura 2: Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de nitrogênio quando foi fornecido 40 kg ha^{-1} de potássio.

A partir da dose de 100 kg ha^{-1} , o aumento no fornecimento de nitrogênio promoveu uma redução da atividade da enzima. Provavelmente tal comportamento se deve ao fato de que nas doses mais altas de nitrogênio, a atividade da enzima tenha sido limitada pela ausência de outros nutrientes, como o molibdênio. Malavolta & Moraes (2007), citam que o efeito do excesso de nitrogênio na forma de amônio pode ser confundido com a modificação do pH do meio, inclusive do solo. Esse abaixamento pode afetar a disponibilidade de outros elementos como fósforo e micronutrientes. Fancelli & Tsumanuma (2007), relatam que doses elevadas de nitrogênio no sulco da semeadura podem favorecer a acidificação ou alcalinização da rizosfera em função da fonte empregada, afetando o desempenho das raízes, a vida no solo e a taxa de absorção de micronutrientes.

De acordo com Viana (2007), o maior fornecimento do nitrogênio, utilizando como fonte a uréia, pode promover maior excreção de íons H^+ pelas raízes das plantas e, conseqüentemente, ocasionar a diminuição do pH e a disponibilidade de molibdênio nessas condições. O pH da rizosfera diminui com a absorção de amônia (NH_4^+), causando exsudação de prótons (H^+) pelas raízes para manter a eletroneutralidade ou o balanço de cargas dentro da planta. Com a diminuição do pH o molibdênio torna-se indisponível para a planta, e em casos de deficiência desse nutriente a atividade da redutase do nitrato em plantas não leguminosas é reduzida em cerca de 26% (Viana, 2007). Apesar da pequena quantidade absorvida pela planta, o molibdênio exerce papel indispensável na assimilação do nitrato absorvido pelas plantas, atuando diretamente ao nível da redutase do nitrato.

Na melhor dose de nitrogênio (100 kg ha^{-1}), foi possível observar que o potássio contribui com 30% de aumento na atividade enzimática da dose zero para dose de 40 kg ha^{-1} (Figura 3). Este fato pode indicar que o potássio potencializa a atividade da enzima redutase do nitrato. Em todos os tratamentos foi observado comportamento semelhante, evidenciando a participação do potássio na atividade enzimática da redutase do nitrato e em plantas jovens de milho. No entanto, esses resultados podem ter sofrido influência das características químicas do solo, que neste caso, apresentava

$$Y = 13,166 + 0,307x - 0,004x^2 - 1,812 \times 10^{-5}x^3$$
$$R^2 = 91,29\%$$

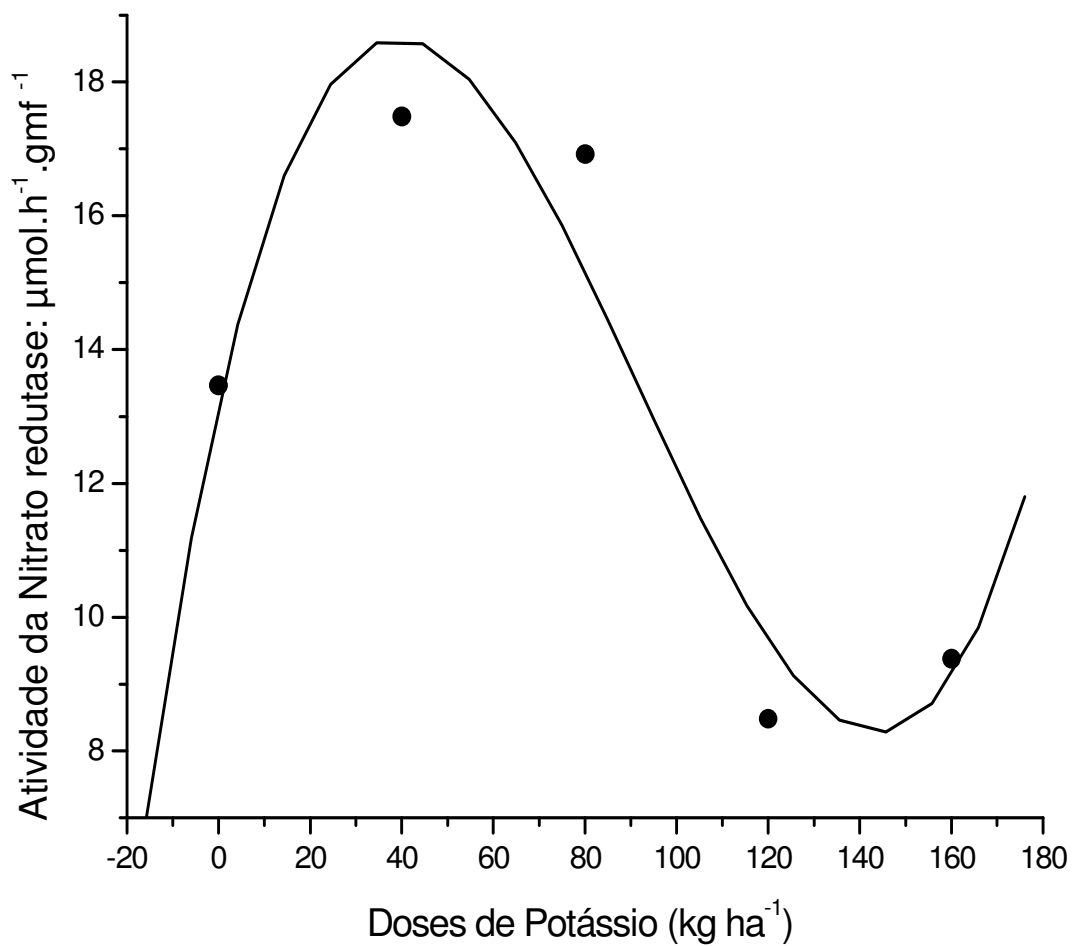


Figura 3: Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de potássio quando foi fornecido 100 kg ha^{-1} de nitrogênio .

uma concentração média de potássio ($31,00 \text{ mg dm}^{-3}$), impossibilitando a verificação com maior clareza do potencial do potássio sobre a atividade da enzima redutase do nitrato, na melhor dose de nitrogênio.

Esta influência do potássio sobre a redutase do nitrato pode ser associada ao fato deste nutriente participar da regulação da absorção do nitrato pelas raízes das plantas. De acordo com Krauss (2005), quando o nitrato é reduzido nas folhas, é formado malato em resposta ao aumento do pH interno do tecido. Parte do malato é transferido ao floema e acompanhado pelo potássio para ser translocado para as raízes, local onde sofre a descarboxilação. O ácido carbônico produzido é liberado no meio em troca do nitrato absorvido, assim controlando a absorção do nitrato. O potássio recirculado serve como contra-íon para o transporte de nitrato no xilema até a parte aérea.

Plantas com inadequado suprimento de potássio reduzem a eficiência do transporte de nitrato para parte aérea. Isto induz a redução do nitrato e acumulação de aminoácidos nas raízes, uma vez que qualquer sinal de excesso de nitrato, induz uma resposta negativa nas raízes para cessar absorção de nitrato, embora o nitrato possa estar presente na rizosfera da planta (Krauss, 2005), reduzindo a quantidade de nitrato no citoplasma, substrato da enzima redutase do nitrato.

Segundo Pretty (1982) a atividade da redutase do nitrato mais baixa na parte aérea de plantas do que nas raízes, se deve ao importante papel desempenhado pelo potássio na translocação do nitrato. Plantas jovens de cevada cultivadas com teor baixo de potássio, apresentavam baixa acumulação de nitrato, assim como a atividade da enzima nitrato redutase (Blevins et al., 1978).

Por outro lado o excesso de potássio (160 kg ha^{-1}) nos diversos níveis de nitrogênio trouxe diminuição da atividade enzimática, não ultrapassando a $10,0 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gm}^{-1}$, exceto na interação das maiores doses de nitrogênio e potássio, ($N = 200 \text{ kg ha}^{-1}$ e $K = 160 \text{ kg ha}^{-1}$) nessa combinação atividade da enzima atingiu valores na ordem de $17,0 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gm}^{-1}$, as maiores médias registradas no experimento. Isto pode ser verificado na Figura 4.

$$Y = 4,584 + 0,159x - 0,001x^2 - 7,360 \times 10^{-6}x^3$$
$$R^2 = 97,32\%$$

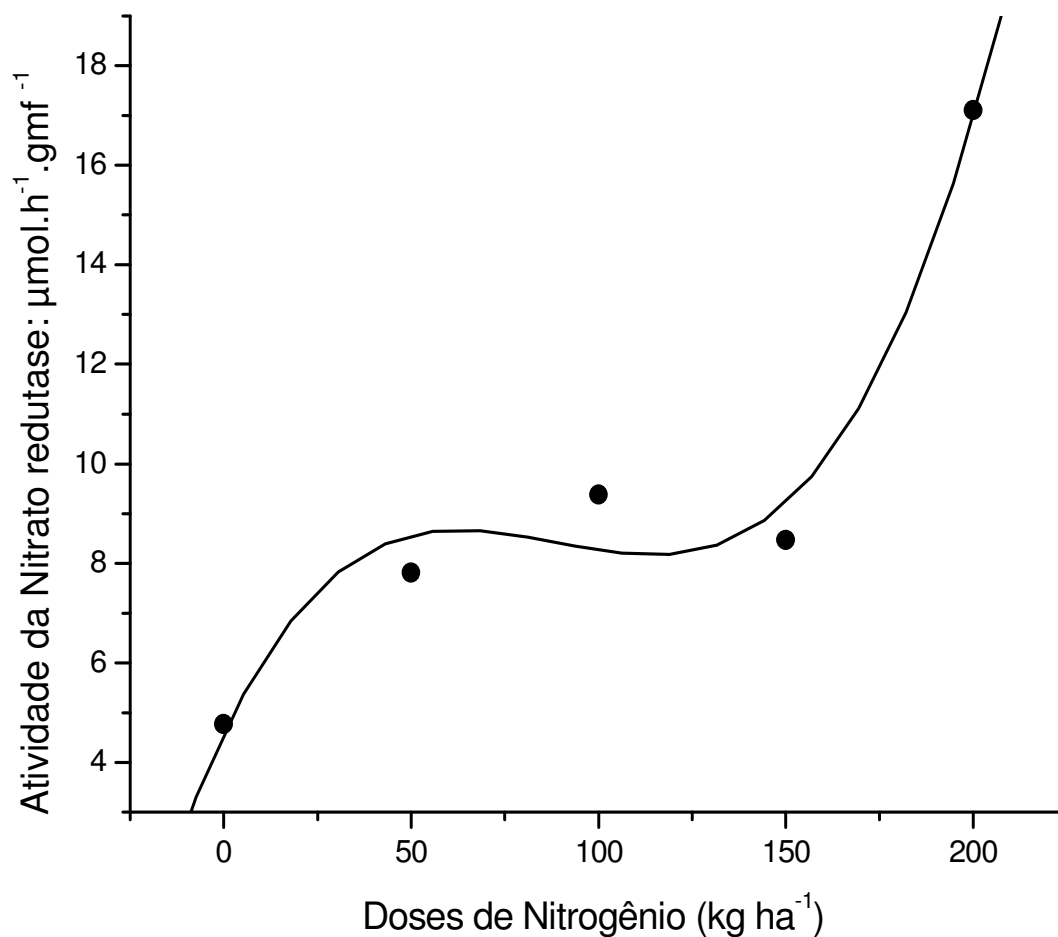


Figura 4: Atividade da enzima redutase do nitrato em função das doses de nitrogênio quando foi fornecido 160 kg ha^{-1} de potássio.

De acordo com Stromberger et al. (1994), nas plantas de milho o potássio participa de números processos que envolvem o nitrogênio na planta. No entanto o excesso de potássio restringe a absorção de nitrogênio.

Nesse caso a atividade enzimática pode ter sido afetada pelo efeito salino devido ao excesso do fertilizante potássico fornecido na forma de cloreto de potássio. Considerado uma espécie moderadamente sensível à salinidade, o milho sofre redução progressiva do crescimento, com o aumento da concentração de sais no meio radicular (Ferreira et al., 2007). Vários trabalhos reportam os efeitos deletérios do estresse salino sobre o crescimento do milho, independentemente da variável utilizada para esta avaliação (Totawat & Mehta, 1985; Izzo et al., 1991; Hasaneen et al., 1994 ; Saneoka et al., 1995).

Segundo Sagi & Lips (1998) a enzima redutase do nitrato tem sua síntese afetada por variações no suprimento de nitrogênio e pela salinidade do solo. Uma das explicações mais aceita para a inibição do crescimento pela condição salina do solo é o desvio de energia do crescimento para a manutenção, isto é, a redução na matéria seca pode refletir o custo metabólico de energia, associado à adaptação a salinidade e redução no ganho de carbono (Viegas, 2004). Provavelmente o gasto de energia para adaptação da planta a salinidade pode ter interferido na atividade da enzima redutase do nitrato, uma vez que, esta enzima utiliza energia advinda da fotossíntese e é fortemente regulada pelo fornecimento de esqueletos carbônicos para incorporação de nitrogênio em aminoácidos. Segundo Epstein & Bloom (2005) um quarto do gasto energético dos vegetais está relacionado com as várias reações na redução do nitrato e incorporação do N às formas orgânicas.

Camargo et al. (2008) trabalhando com a cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) observaram que o estresse salino provocou redução na atividade da enzima redutase do nitrato, este fato tem sido associado a um efeito direto da redução do potencial de água do tecido, provocado pela salinidade sobre a atividade ou a indução da síntese da redutase do nitrato (Rao & Gnanam, 1990).

A combinação das doses de 160 kg ha⁻¹ potássio e 200 kg ha⁻¹ de nitrogênio produziu um efeito bastante diferente na atividade enzimática. Na dose de 160 kg ha⁻¹ de potássio combinada com as diferentes doses de nitrogênio houve uma drástica redução na atividade da enzima, porém quando essa dose foi combinada com a maior dose de nitrogênio a atividade enzimática dá um salto e atingiu valores de até 17,10 $\mu\text{moles NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ gmf}^{-1}$, o que não encontra explicação na literatura.

CONCLUSÃO:

A atividade enzimática respondeu significativamente à interação nitrogênio x potássio. A interação N = 100 kg ha⁻¹ e K = 40 kg ha⁻¹ proporcionaram os melhores resultados da enzima redutase do nitrato, coincidindo com a adubação recomendada para esta região. O excesso de nitrogênio a partir de 100 kg ha⁻¹, e de potássio a partir de 40 kg ha⁻¹ podem causar redução na atividade enzima redutase do nitrato em solos que apresentam concentrações médias de potássio.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARAUJO, L.A.N. ; FERREIRA, M. E ; CRUZ, M. C. P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.771- 777, 2004.

BACHMANN, M; McMICHAEL, R.N.; HUBER, J.L. et al. Partial purification and characterization of a calcium – dependent protein kinase and an inhibitor protein required for the activation of spinach leaf nitrate reductase. **Plant Physiology**, Rockville, v.108, p.1083-1091, 1995.

BLEVINS, D.G.; HIATT, A.J.; LOWE, R.H; LEGGETT J.E. Influence of K on the uptake, translocation and reduction of nitrate by barley seedlings. **Agronomic Journal**. V. 55, p. 465-470, 1978.

BLOOM, A. J, SUKRAPANNA, S.S.; WARNER,R.L Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99 p. 1294 -1301, 1992.

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

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. & JONES, R.L., **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 3 ed. Maryland : American Society of Plant Physiologists, 2001, 1367p.

BULL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFÓS, 1993. p. 63-145.

CAMARGO, P.M.P et al. Mecanismos de tolerância ao estresse salino relacionados com o metabolismo de nitrogênio e ajustamentadores osmótico em plantas de sorgo [*sorghum bicolor* (L.) moench] In: VI SEMINARIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA/UFRA E XII SEMINARIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 2008, Belém, PA. **Anais...**, Belém : Universidade Federal Rural da Amazônia, 2008.

CAMARGOS, L. S.: **Análise das alterações no metabolismo de nitrogênio em *canavalia ensiformes* (L.) em resposta a variações na concentração de nitrato fornecida.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) ESALQ, Piracicaba, 2002.

CAMARGOS, L.S; **Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados em *calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio: efeitos na nodulação e na fixação.** Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - UNICAMP, Campinas , 2007

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.50, p.277-303, 1999.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. **Tecnologia de produção de milho.** Viçosa: UFV, p. 139-182, 2004.

CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T. et al. Nitrogen and sulfur In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. Cap. 16, p. 786-849.

CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, v.7, p. 859-868, 1995.

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

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J . **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives**. Sunderland, Sinauer Associates, 2005. 400p.

FANCELLI, A. L. & TSUMANUMA, G. M. Nitrogênio e Enxofre nas culturas de milho e feijão. In: YAMADA, T. et al. **Nitrogênio e Enxofre na agricultura Brasileira**. Piracicaba: IPNI, 2007. Cap.13, p. 445-482.

FARINELLI, R.; FORNASIERI FILHO, D.; PENARIOL, F.G.; BORDIN, L.; LEMOS, L.B. Influência da adubação nitrogenada e potássica nos componentes de produção de arroz de terras altas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. 1 CD – ROM.

FERREIRA, P.A; GARCIA, G.O. de; MIRANDA, G.V.; OLIVEIRA, F.G.; SANTOS, D.B. **Tolerância da variedade milho ufvm 100 à salinidade avaliada por três métodos**. Irriga, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 532-544, 2007

HAGEMAN, R.H.; REED, A.J. **Nitrate reductase from higher plants**. San Diego: Academic Press, 1980. p.270-280.

HASANEEN, M.N.A.; EL-SAHT, H.M.; BASSYONI, F.M. Growth, carbohydrates and associated invertase and amylase activities in castor bean and maize as affected by metribuzin and NaCl. **Biologia Plantarum**, Prague, v.36, p.451-459, 1994.

IZZO, R. NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, F. Growth and mineral absorption in maize seedlings as affected by increasing NaCl concentrations. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.14, p.687-699, 1991.

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

KLEPPER, L., FLESHER, D. E., HAGEMAN, E. H. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.48, p.580-90, 1971.

KRAUSS A. Potassium effects on yield quality. In: YAMADA, T.; ROBERTS, T.L. (Ed.). **Potássio na agricultura brasileira**. Piracicaba: Instituto da Potassa e do Fosfato, Instituto Internacional da Potassa, 2005. p. 239-256

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T., OLIVEIRA, I. C. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 569-593, 1996.

LAVRES JUNIOR, J. **Combinações de doses de nitrogênio e potássio para o capim- Mombaça**. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – ESALQ, Piracicaba, 2001.

LEA, P.J. Primary nitrogen metabolism. In: Dey, P.M.; Harbone, J.B. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 273-306.

LILLO, C.; LEA, U.S.; LEYDECKER, M.T.; MEYER, C. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme in vivo and nitrite accumulation. **The Plant Journal**, v.35 p.566-573, 2003.

LOUÉ, A. The interaction of potassium with other growth factors, particularly with other nutrients. In: CONGRESS INTERNATIONAL OF THE POTASH INSTITUTE, 11. p. 407-433. 1978, Bern. **Proceedings...**Bern: International Potash Institute, 1978.

MAJEROWICZ, N.; SILVA, J. M. P.; MEDICI, Leonardo Oliveira ; BISON, O. ; PEREIRA, M. B. ; SANTOS JUNIOR, U. P. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 129-136, 2002.

MALAVOLTA, E., MORAES, M.F. Fundamentos do Nitrogênio e Enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: YAMADA, T. et al. **Nitrogênio e Enxofre na agricultura Brasileira**. Piracicaba: IPNI, 2007. Cap. 6, p. 189-249.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319.p

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

MELGAR, R.J.; SMYTH, T.J.; CRAVO, M.S.; SANCHEZ, P.A. Doses e épocas de aplicação de fertilizante nitrogenado para milho em latossolo da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 15 p.289-296, 1991.

MEGURO, N. E.; MAGALHÃES, A. C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 156-159, 1987.

MEGURO, N. E., MAGALHÃES, A. C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1725-31, 1982.

MENGEL, K. Potassium movement within plants and its importance in assimilate transport . In MUNSON. R.D. **Potassium in agriculture**. Madison : American Society of Agronomy , 1985. p.397-411

MENGEL, K.; KIRKBY, EA. **Principles of plant nutrition**. London: Kluwer Academic, 2001.

MENGEL, K.; KIRKBY, EA. **Principles of plant nutrition**. Intern: Potash , Berna ,Suíça 1978.

NETTO, J. F. A.; **A atividade da enzima redutase do nitrato e glutamina sintase em cafeeiro Arábica**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - ESALQ. Piracicaba, 2005.

OAKS, A., HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, 1985, v.36, p.345-365

PRETTY, K. M. O potássio e a qualidade dos produtos agrícolas. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILLI, O.; USHERWOOD, N.R. **Potássio na agricultura brasileira**. Piracicaba: POTAFOS, 1982.

PÖTTKER, D.; ROMAN, E.S. Efeito do nitrogênio em trigo cultivado após diferentes sucessões de culturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 501-507, 1998. Número especial.

RAO, K.R.; GNANAM, A. Inhibition of nitrate reductase activity by salinity stress in (*Sorghum vulgare*). **Phytochemistry**, Melbourne, v.29, p.1047-1049, 1990.

ROSOLEM, C.A. Interação de potássio com outros íons. In: YAMADA, T.; ROBERTS, T.L. **Potássio na agricultura brasileira**. Piracicaba: POTAFOS, 2005. p. 239-256

RUAN, J.; WU, X.; YE, Y.; HARDTER, R. Effect of potassium, magnesium and sulphur applied in different form of fertilizers on free amino acid content in leaves of tea (*Cameilia sinensis L.*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 76, p. 389-396, 1998.

SAGI, M.; LIPS, H. S. The levels of nitrate reductase and MoCo in annual ryegrass as affected by nitrate and ammonium nutrition. **Plant Science**, v.135, p.17-24, 1998.

SANTOS, A.R. **Diagnose nutricional e respostas do Capim-Braquiária submetido a doses de nitrogênio e enxofre**. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) ESALQ, Piracicaba, 1997.

SANEOKA, H.; NAGASAKA, C.; HAHN, D.T.; YANG, W.J.; PREMACHANDRA, G.S.; JOLY, R.J.; RHODES, D. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and-containing maize lines. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.631-638, 1995.

SOLOMONSON, L. P.; BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.225-253, 1990.

SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2 ed. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.129-145.

STROMBERGER, J.A.; TSAI, C.Y.; HUBER, D.M. Interactions of potassium with nitrogen and their influence on growth and yield potential in maize. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 17, n. 1, p. 19-37, 1994.

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

TOTAWAT, K.L.; MEHTA, A.K. Salt tolerance of maize and sorghum genotypes. **Annals of Arid Zone**, Jodh Pur, v.24, p.229-236, 1985.

VIANA, E. M.: **Interação de nitrogênio e potássio na nutrição, no teor de clorofila e na atividade da enzima redutase do nitrato em plantas de trigo**. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas), ESALQ, Piracicaba, 2007.

VIÉGAS, R. A. et al. Redução assimilatória de NO_3^- em plantas de cajueiros cultivados em meio salinizado. **Revista brasileira de engenharia agrícola ambiental**. Campina Grande, v.8, n.2, p.189-195, 2004.

XU, G.; WOLF, S.; KAFKAFI, U. Ammonium on potassium interaction in sweet pepper. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 4, p. 719-734, 2002.

WENGLING, A. **Recomendação de adubação nitrogenada para Trigo em sucessão ao milho e soja sob sistema plantio direto no Paraguai**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) UFMS, Santa Maria, 2005.

YAMADA, T. Adubação nitrogenada do milho. Quanto, como e quando aplicar? **Informações Agronômicas**, Piracicaba: POTAFÓS, n.74, p.1-5, 1996.

ANEXO 1: RETA PADRÃO DE NITRITO

