

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

TALITA SLOTA KUTZ

**ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM LEGUMINOSAS SOB
DOSES DE MOLIBDÊNIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2015

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

TALITA SLOTA KUTZ

**ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM LEGUMINOSAS SOB
DOSES DE MOLIBDÊNIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2015**

TALITA SLOTA KUTZ

**ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM LEGUMINOSAS SOB
DOSES DE MOLIBDÊNIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. Thiago de Oliveira Vargas

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Faneco Pereira

Co-Orientadora: Prof^a. D^a. Marisa de Cacia Oliveira

PATO BRANCO

2015

Slota Kutz, Talita

Atividade da nitrato redutase em leguminosas sob doses de molibdênio / Talita Slota Kutz.

Pato Branco. UTFPR, 2015

37 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Thiago de Oliveira Vargas

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Faneco Pereira

Co-Orientadora: Prof^a. D^a. Marisa de Cacia Oliveira

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. Pato Branco, 2015.

Bibliografia: f. 33 – 35

1. *Crotalaria Juncea*. 2. *Canavalia Ensiformis*. 3. Feijoeiro. I. Vargas, Thiago de Oliveira, II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. III. Título.

CDD: 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias
Curso de Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC

ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM LEGUMINOSAS SOB DOSES DE
MOLIBDÊNIO

por
TALITA SLOTA KUTZ

Monografia apresentada às 09 horas do dia 24 de novembro de 2015 como requisito parcial para obtenção do título de ENGENHEIRA AGRÔNOMA, Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo-assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Eng. Agr. Fernanda D. Brandelero
UTFPR

Prof^a. Dr^a. Giovana Faneco Pereira
UTFPR
Co-Orientadora

Prof^a. Dr^a. Marisa de Cacia Oliveira
UTFPR
Co-Orientadora

Prof. Dr. Thiago de Oliveira Vargas
UTFPR
Orientador

Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma ajudaram em sua execução, estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre abençoar meu caminho e me dar forças para vencer esta etapa.

Aos meus pais que admiro muito, minha mãe Lúcia, que com todo o carinho do mundo, sempre esteve comigo, mesmo que longe, torcendo e me apoiando, e meu pai Augusto, que deu o máximo de si para que eu chegasse até aqui.

A todos os professores do Curso de Agronomia da UTFPR, que foram importantes tanto em vida acadêmica quanto pessoal, colaborando com seus ensinamentos e exemplos de vida.

Aos funcionários da UTFPR, seu Otávio em especial, que além de auxiliar em vários momentos, sempre me ouvia naqueles dias difíceis e muitas vezes contribuiu com seus conselhos e lições de vida que jamais esquecerei.

Em especial ao meu Orientador, Professor e assim posso considerar, amigo Thiago de Oliveira Vargas, aquele que sempre me ajudou e ao qual devo respeito e admiração pelo seu caráter, profissionalismo e bom humor do dia a dia.

As minhas Co-Orientadoras Marisa de Cácia Oliveira e Giovana Faneco Pereira, pelas instruções e orientação.

Meu agradecimento especial, a minha amiga e irmã de coração Jéssica Cardoso, parceira em todos os momentos, seja nos estudos e na vida pessoal, com essa “menina” aprendi que mesmo na hora da tristeza, nós sempre podemos dar um “jeitinho” de sorrir.

A Eng. Agr. Fernanda Daniela Brandelero que cedeu uma parte de seu plano de trabalho de mestrado à execução do trabalho em questão, além da amizade e apoio.

A todos que contribuíram para minha formação, o meu muito obrigada.

“As melhores coisas da vida, não podem ser vistas nem tocadas, mas sim sentidas pelo coração” (Dalai Lama).

RESUMO

SLOTA KUTZ, Talita. ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE EM LEGUMINOSAS SOB DOSES DE MOLIBDÊNIO. 37 f. TCC (Curso de Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

O manejo de plantas fixadoras de nitrogênio é uma das principais vias biológicas de aporte de nitrogênio. O emprego de técnicas que possam maximizar o potencial de fixação biológica, como a aplicação de Mo em leguminosas, pode influenciar no metabolismo do N. Objetivou-se avaliar a atividade da enzima nitrato redutase em leguminosas sob doses de molibdênio. O experimento foi realizado na UTFPR, Câmpus Pato Branco, onde foram utilizadas duas espécies de leguminosas de adubação verde, crotalária-juncea (*Crotalaria juncea*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), e quatro doses de molibdênio (0, 40, 80 e 120 g ha⁻¹) na forma de molibdato de sódio, aplicados via foliar nos adubos verdes, e posteriormente, nas mesmas parcelas onde estes foram manejados cultivou-se o feijoeiro, sem nenhuma fertilização adicional. Foi realizado também um pré-teste onde avaliou-se três porções da parte aérea dos adubos verdes. A coleta das amostras para a análise da atividade da nitrato redutase foi realizada para os adubos verdes aos 90 DAS e no feijoeiro aos 66 DAS. O feijão-de-porco apresentou valores superiores para a NR nos terços superiores e médio em comparação a crotalária. Não houve diferença estatística entre as porções dentro de cada espécie. A crotalária apresentou efeito quadrático positivo para a NR em relação as doses de Mo aplicadas, já o feijão-de-porco apresentou efeito quadrático negativo. O efeito residual das doses de Mo aplicadas nos adubos verdes sob a NR no feijoeiro demonstrou uma resposta quadrática negativa para ambas as espécies.

Palavras-chave: *Crotalaria juncea*. *Canavalia ensiformis*. Feijoeiro.

ABSTRACT

SLOTA KUTZ, Talita. NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN LEGUMES UNDER MOLYBDENUM DOSES. 37f. TCC (Course of Agronomy) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

The management of nitrogen-fixing plants is a major biological route of nitrogen input. The use of techniques to maximize the potential for biological fixation, such as the application of Mo in legumes crops, may influence the metabolism N. This study aimed to evaluate the enzyme nitrate reductase activity in legumes under molybdenum doses. The experiment was carried out in UTFPR, Pato Branco campus, were used two species of green manure legumes, sunn hemp (*Crotalaria juncea*) and jack beans (*Canavalia ensiformis*) and four molybdenum doses (0, 40, 80 and 120 g ha⁻¹) in the form of sodium molybdate, foliarly applied in green manures, and thereafter, at the same plots where such were managed common bean plants were crop without any additional fertilization. It was also performed a pretest where we evaluated three parts of shoots of green manures. The collection of samples for the analysis of nitrate reductase activity was performed for green manure at 90 DAS and for common bean at 66 DAS. The jack beans showed higher values for NR in the superior and middle parts compared with sunn hemp. There was no statistical difference between the portions within each species. The sunn hemp showed a positive quadratic effect for the NR in relation to Mo doses applied, and jack beans showed a negative quadratic effect. The residual effect of Mo doses applied in green manures in the NR in common bean showed a negative quadratic response for both species.

Keywords: *Crotalaria juncea*. *Canavalia ensiformis*. Bean.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Atividade da Nitrato Redutase (NR) em adubos verdes sob doses de molibdênio aos 90 dias após a semeadura. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).....28
- Figura 2** – Atividade da Nitrato Redutase (NR) no feijoeiro em função da adubação verde e doses de Mo aos 66 dias após a semeadura. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).....29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios da NR em $\text{mmol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF nos adubos verdes *Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis* em relação as porções (terço inferior, médio e superior) da parte aérea dos adubos verdes. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).....27
- Tabela 2** – Valores médios da atividade da Nitrato Redutase (NR) no feijoeiro sobre o efeito residual dos adubos verdes *Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis* sob as doses de Mo (0, 40, 80 e 120 g ha⁻¹) em comparação com a testemunha de feijoeiro. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).....30

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

NR	Atividade da Nitrato Redutase
ATP	Adenosina trifosfato
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
NR	Nitrato Redutase
DAE	Dias Após Emergência
DAS	Dias Após Semeadura
MF	Matéria Fresca de folhas
UE	Unidades Experimentais
NH_3^+	Amônia
N	Nitrogênio
NH_4^+	Amônio
NO_3^-	Nitrato
O_2	Oxigênio
O_3	Ozônio
KNO_3	Nitrato de Potássio

LISTA DE ABREVIATURAS

pH	potencial hidrogeniônico
Mo	Molibdênio
Pa	Pressão atmosférica
m ²	Metros quadrados
g	Gramas
ha	Hectare
et al.	e colaboradores
m	Metros
nm	Nanômetro
ml	Mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
>	Maior do que
%	Porcentagem
≤	Menor ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	31
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Dentro de um sistema de produção orgânico, o correto manejo de plantas fixadoras de nitrogênio é um dos principais métodos biológicos de aporte de nitrogênio. Além disso, influencia diretamente e indiretamente na qualidade do solo, tanto em suas propriedades físicas, químicas como biológicas, podendo assim, potencializar os recursos disponíveis dentro da propriedade agrícola.

Portanto, conhecer técnicas ou processos que possam maximizar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) dentro de um ambiente produtivo, tem-se tornado foco de estudos, pois, fatores bióticos e abióticos podem vir a interferir em uma nodulação eficiente, como no caso das leguminosas, acarretando em algumas limitações da FBN. Assim, diversos estudos genéticos e moleculares relacionados ao comportamento e seleção de estirpes, sua relação com o pH, temperatura, estresse hídrico, entre outros fatores, estão sendo pesquisados (HUNGRIA; VARGAS, 2000; REIS; JÚNIOR, 2008)

Desse modo, antes de aplicar qualquer técnica é importante conhecer o comportamento das plantas fixadoras de nitrogênio que se deseja trabalhar, perante os fatores apontados anteriormente. Um nutriente que tem grande importância nesse contexto, é o molibdênio (Mo), pois, além de ser constituinte do complexo enzimático da nitrogenase, enzima esta responsável por catalisar a reação de transformação do nitrogênio atmosférico (N_2) em NH_3 , também é constituinte da enzima nitrato redutase (NR), responsável pela assimilação do N do solo (TAIZ; ZEIGER, 2012).

Atualmente, aplicações de Mo em feijoeiro, têm sido frequentemente adotadas em algumas regiões produtoras. Matoso e Kusdra (2014), avaliando a aplicação de duas fontes de molibdênio via semente (molibdato de sódio e molibdato de amônio), demonstraram que o molibdato de amônio é a melhor fonte para elevar a massa de nódulos formados por rizóbios nativos. Por outro lado, o emprego do Mo via foliar também é muito usual, pois, sua aplicação parcelada na dose de 60 g ha^{-1} , entre os 15 e 30 dias após a emergência (DAE) do feijoeiro incrementa a formação

de nódulos, o teor de nitrogênio foliar, o número de grãos por vagens, a massa de 100 grãos e a produtividade em comparação a aplicação molíbdica via semente ou a sua ausência da adubação para as três cultivares estudadas (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Apesar do grande número de trabalhos indicando os benefícios da aplicação molíbdica em leguminosas, como o feijão e a soja, o conhecimento da aplicação deste microelemento nas espécies de adubação verde e seu efeito nas culturas sucessoras são escassos. Partindo da hipótese de que a presença do molibdênio é considerada crucial tanto para o processo de FBN, assim como, para a assimilação de nitrato, sua aplicação poderia gerar incrementos na produção de nitrogênio pelas bactérias simbióticas e elevar a atividade da NR, gerando assim, grandes benefícios aos cultivos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade da nitrato redutase (NR) em leguminosas sob doses de molibdênio.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade da NR nas porções da parte aérea (terço inferior, médio e superior) dos adubos verdes *Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis*;

Avaliar a atividade da NR em duas espécies de adubos verdes, *Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis*, em função de doses de molibdênio (Mo);

Avaliar o efeito residual das doses de Mo aplicadas nos adubos verdes sob a atividade da NR no feijoeiro.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Os ciclos biogeoquímicos envolvem interações entre solo e atmosfera, sendo baseados na circulação dos nutrientes entre os diversos compartimentos, onde o nitrogênio (N) é pertencente a um ciclo gasoso, pois, entra e sai da biosfera na forma gás (GOMES et al., 2008).

Os compartimentos podem ser bióticos e abióticos, compostos por subcompartimentos e complexos mecanismos de transferência, permitindo que os ciclos biogeoquímicos sejam policíclicos, de modo que, um elemento circule ao longo de muitos processos dentro de um mesmo compartimento (NEWBOULD, 1978).

As práticas agrícolas adotadas pelo homem nos agroecossistemas e as condições climáticas existentes podem afetar diretamente nas etapas dos ciclos biogeoquímicos, principalmente em sua estabilidade. Como por exemplo, a aplicação de fertilizantes, exportação de nutrientes via produtos agrícolas, volatilização de nutrientes e lixiviação, entre outros processos que interferem nas entradas e saídas de elementos em um sistema (GOMES et al., 2008).

O N é um elemento em grande abundância na atmosfera, constituindo 78% dos gases desta, porém, é um elemento muito estável e encontra-se em carência nas formas disponíveis para as plantas, apesar de ser um dos nutrientes mais necessários ao desenvolvimento dessas, pois, é um importante constituinte celular, incluindo principalmente as proteínas, membranas e diversos hormônios vegetais (SOUZA; FERNANDES, 2006; GOMES et al., 2008).

Para as plantas, três são as principais fontes de N disponíveis: o solo com a decomposição da matéria orgânica, a adubação mineral oriunda da produção industrial e a fixação biológica (PESSOA et al., 2000). Todo o N disponível, era anteriormente nitrogênio gasoso (N₂), que passou por algum processo físico-químico e/ou biológico de transformação e devido ao processo de desnitrificação uma grande parte do N fixado volta para a atmosfera (GOMES et al., 2008).

O N_2 oriundo da atmosfera contribui, também, com uma pequena porção do nitrogênio combinado, advindo das queimas industriais, de atividades vulcânicas e de incêndios florestais que geram o amônio (NH_4^+), além do nitrato (NO_3^-), originado da oxidação do N_2 pelo O_2 ou pelo ozônio (O_3) na presença de descargas elétricas ou de radiação ultravioleta (KERBAUY, 2012).

A chuva pode carrear o NH_4^+ e o NO_3^- para o solo que, posteriormente, podem ser absorvidos pelas raízes das plantas. As transformações biológicas ocorrem, principalmente, com o N combinado no solo, pois as plantas, após absorverem o nitrato (composto altamente oxidado preferível), devem reduzir este para posterior incorporação nos diversos constituintes celulares (KERBAUY, 2012).

Fertilizantes industriais nitrogenados são muito utilizados na agricultura, apesar de apresentarem uma parcela muito pequena em relação ao total do nitrogênio fixado biologicamente. Esses fertilizantes são obtidos através do processo de Haber Bosch, que sob elevadas temperaturas ($> 400^\circ C$) e pressão ($> 107 Pa$) quebram a tripla ligação que une os dois átomos de N. Para a concretização do processo é utilizada uma grande quantidade de energia advinda do petróleo, o que acaba encarecendo o processo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2012).

Vários estudos indicam que a fixação biológica de nitrogênio é a maior contribuinte para a entrada de nitrogênio molecular no ciclo biogeoquímico do nitrogênio, pois, o processo de adição de adubos químicos nitrogenados, além de apresentar elevado custo financeiro, apresenta perdas relevantes deste para o meio ambiente, já que 50% do N adicionado na forma de fertilizante é perdido por lixiviação e/ou na forma de gases (YAMADA et al., 2007).

A FBN é um processo mediado por seres procariotos, normalmente de vida livre, de alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, sendo as mais conhecidas são as bactérias diazotróficas associativas que nodulam as leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em espécies vegetais, as espécies fixadoras de N_2 podem, além de colonizar a rizosfera, ocorrer endofiticamente, as quais são principalmente encontradas em gramíneas, apesar de também poderem ser localizadas nas leguminosas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A ocorrência da FBN só é possível pela existência da enzima nitrogenase nesses microrganismos, já que esta possui um complexo enzimático que quebra a tríplice ligação do N_2 . Esse complexo é formado por duas unidades, a Fe-proteína (dinitrogenase redutase) e a MoFe-proteína (dinitrogenase), a primeira é responsável pela transferência de elétrons para a redução do N_2 e devido à atividade redox, pode ser afetada pela presença de oxigênio (REIS; TEIXEIRA, 2005). Para isso, os diazotróficos aeróbicos desenvolveram vários mecanismos de proteção do sítio da nitrogenase. Dentre eles, destaca-se a leg-moglobina, a qual é responsável por manter constante a taxa de O_2 e em baixas concentrações, além de dar ao nódulo uma cor avermelhada, que o caracteriza como ativo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Para que a nitrogenase consiga efetivar o processo de quebra do N_2 , uma grande quantidade de fotossintatos é exigida da planta, pois, para cada 2 NH_3 , 16 ATPs (adenosina trifosfato) são requeridos (REIS; TEIXEIRA, 2005).

A atividade da nitrogenase é muito estudada atualmente, pois a forma de se produzir nitrogênio mineral para as plantas industrialmente ainda vem sendo a mesma de anos atrás (processo de Haber Bosch). Portanto, se os cientistas conseguissem decifrar todo o mecanismo nitrogenase, talvez poderiam reproduzir este processo industrialmente, sem um gasto energético tão grande, como é realizado nos dias de hoje.

A FBN é muito importante em diversas culturas, sendo o exemplo da soja o mais difundido, já que inoculantes para essa cultura são vendidos atualmente em larga escala, além de não ser recomendada a aplicação de nenhuma outra fonte de N no plantio. Além da soja, existem outras culturas que podem vir a ser inoculadas, como o feijão, milho, cana-de-açúcar e inclusive os adubos verdes (YAMADA et al., 2007).

Apesar de o feijoeiro ser uma leguminosa capaz de estabelecer simbiose com algumas espécies de bactérias da família Rhizobiaceae, diferentemente da soja, a FBN não supre totalmente sua necessidade de N (MATOSO; KUSDRA, 2014), sendo necessária muitas vezes a adubação nitrogenada. Nesse contexto, principalmente para o feijoeiro, diversos trabalhos

demonstram que o desempenho tanto da FBN quanto do melhor aproveitamento da adubação mineral nitrogenada esta diretamente influenciada pela aplicação de Mo.

No solo o Mo pode ocorrer em sua solução, imobilizado na matéria orgânica, adsorvido na fração coloidal e retido nos minerais primários, portanto, sua disponibilidade esta correlacionada principalmente com o pH, teor de matéria orgânica e quanto à textura do solo (ABREU et al., 2007). A maior disponibilidade desse micronutriente ocorre em pH acima de 7,0, solos que apresentem pH inferiores a 5,5, já poderiam acarretar em deficiência molíbdica para os cultivos (ABREU et al., 2007).

O molibdênio é um micronutriente exigido em menor quantidade no desenvolvimento das plantas, sua deficiência é prejudicial, sendo esta visualizada via clorose generalizada entre as nervuras e necrose das folhas mais velhas (TAIZ; ZEIGER, 2012). A disponibilidade desse micronutriente pode influenciar na produtividade da cultura, através da FBN, assim como na assimilação do N, sendo cofator da enzima nitrato redutase (PESSOA et al., 2000).

A NR localiza-se no citoplasma das células da epiderme da raiz ou do mesófilo foliar, quando é recém-sintetizada, esta enzima possui uma meia vida de poucas horas e ainda se o teor de nitrato diminuir na planta o teor de NR também decai (TAIZ; ZEIGER, 2012). Quando o NO_3^- é absorvido e ocorre algum fator como estresse, nível baixo de fotossíntese entre outros, esse NO_3^- pode ser carregado para outras células ou depositar-se no vacúolo (SOUZA; FERNANDES, 2006).

As nitrato redutases são compostas por três grupos prostéticos, por subunidades, sendo que o co-fator Mo esta associado a uma pterina formando um complexo molibdopterina, responsável pela última transferência de elétrons advindo do NAD(P)H antes da assimilação do NO_3^- que é reduzido a NO_2^- , que posteriormente será transformado em NH_4^+ pela atividade da enzima nitrito redutase (SOUZA; FERNANDES, 2006).

Estudos quanto a utilização de molibdênio, via adubação estão sendo realizados. Toledo et al. (2010) avaliando os efeitos da aplicação deste micronutriente na nodulação de soja e na atividade da enzima nitrato redutase, concluíram que a nodulação em soja é maior em número e massa de nódulos quando a aplicação do Mo é via semente; já a atividade da enzima nitrato redutase é

maior quando o micronutriente é aplicado via foliar em dose superior à recomendada. Já em estádios tardios de crescimento do feijoeiro, a aplicação foliar deste micronutriente é uma alternativa tecnológica promissora, Kubota et al. (2008) afirmam que essa prática propicia a produção de sementes com teor seis vezes superior aos de plantas que não receberam adubação foliar de 120 g ha⁻¹ aos 45 e 60 DAE. Ainda com esta mesma cultura, Biscaro et al. (2011) observou que a aplicação foliar de Mo quando combinada com a utilização de nitrogênio em cobertura, surte efeito positivo, aumentando a eficiência da adubação, além de gerar um aumento no índice relativo de clorofila nas folhas. Calonego et al. (2010) mostraram também, que a adubação molíbdica no feijoeiro proporciona resposta positiva, pois gerou um incremento de 26% na produtividade desta cultura.

A aplicação de molibdênio tem sido bastante estudada, principalmente em culturas como o feijão e a soja, sendo escassos experimentos que avaliem os efeitos da aplicação foliar desse micronutriente em adubos verdes. Partindo da hipótese de que a presença do Mo é considerada crucial tanto para o processo de FBN, assim como para a assimilação de nitrato, sua aplicação poderia gerar incrementos na produção de nitrogênio pelas bactérias simbióticas e elevar a atividade da NR destes.

Desta forma, a adição de Mo poderia implicar no aumento da FBN pelos adubos verdes que, conseqüentemente, geraria uma maior produção de biomassa, contribuindo de forma positiva para a nutrição nitrogenada das culturas sucessoras, pois a utilização de plantas fixadoras de nitrogênio como adubo, poderia assegurar maior sustentabilidade aos agroecossistemas, já que essa técnica pode acarretar na redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados (PERIN et al., 2004).

Vários estudos afirmam essa vertente, como Vargas et al. (2012) que ao avaliar os efeitos da raiz e da parte aérea de duas leguminosas (*Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis*) sobre a produção do repolho, e comparando-a com a adubação mineral de 100 e 50%, chegou a conclusão de que a aplicação no solo da raiz ou da parte aérea de quaisquer das espécies de leguminosas foi equivalente a 50% da adubação com N-mineral.

Deste modo, se nas lavouras os adubos verdes forem utilizados em consórcio, ou como palhada, vários benefícios podem ser gerados ao produtor rural.

Assim, se a aplicação molíbdica aumentasse a eficiência dos adubos verdes na mesma proporção em que atualmente se conhece para culturas como o feijão e a soja, conseqüentemente esses benefícios poderiam ser transferidos para os cultivos comerciais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal do Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A obtenção das amostras vegetais para análise da enzima nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1) *in vivo* foram provenientes de um ensaio realizado no campo experimental da Instituição, sendo duas espécies de leguminosas de adubação verde, crotalária (*Crotalaria juncea*) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), e quatro doses de molibdênio (0, 40, 80 e 120 g ha⁻¹) na forma de molibdato de sódio, aplicados via foliar nos adubos verdes e, posteriormente, nas mesmas parcelas onde estes foram manejados cultivou-se o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), sem nenhuma fertilização adicional.

A unidade experimental foi constituída de uma área de 2,5 x 5,0 m (12,5 m²). A semeadura dos adubos verdes foi realizada em 22 de outubro de 2014 com espaçamento de 0,45 m entre linhas, sendo 8 sementes por metro de feijão-de-porco e 30 sementes por metro de crotalária-juncea. Após a germinação, foi realizado raleio das plantas a fim de estabelecer um estande de 6 sementes para feijão-de-porco e 22 para crotalária-juncea.

A aplicação de molibdênio nas leguminosas de adubação verde foi realizada 54 dias após a semeadura (DAS), com o auxílio de um borrifador manual. Foram calculadas e diluídas as doses de molibdato de sódio em dois litros de calda para cada parcela, este volume foi aplicado de forma a distribuir uniformemente o produto para cada planta.

No dia 3 de fevereiro, aos 103 DAS foi realizado o manejo dos adubos verdes, por meio de um corte rente ao solo, sendo depositados inteiros dentro das parcelas experimentais sob a superfície do solo. O corte foi realizado com facão, de forma manual para evitar eventual contaminação entre espécies e doses de Mo.

Após o manejo dos adubos verdes, em 09 de fevereiro, foi realizada a semeadura do feijão da cultivar 'Tuiuiu' no espaçamento de 0,45 m entre linhas e 12 sementes por metro, na mesma área, sem qualquer adubação.

A coleta das amostras para a análise da enzima nitrato redutase foi realizada para os adubos verdes aos 90 DAS e no feijoeiro aos 66 DAS. As amostras foliares foram coletadas no início da manhã, acondicionadas em caixa de isopor com gelo para paralisação da atividade enzimática.

As amostras para avaliação da atividade enzimática do feijoeiro foram retiradas do terço médio de cada planta. Na ausência de informação sobre a coleta e análise da enzima nitrato redutase (NR) em espécies de adubos verdes, um experimento preliminar foi realizado para identificar em que porção da parte aérea da planta (terço inferior, médio e superior) apresenta maior atividade.

No pré-teste, o experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 3), sendo duas espécies de leguminosas de adubação verde (crotalária-junceia e feijão-de-porco), três porções da parte aérea (terço inferior, mediana e superior), com seis repetições, totalizando 36 unidades experimentais (UE). As plantas utilizadas neste pré-teste não receberam adubação molíbdica.

Posteriormente, foram realizados mais dois ensaios em laboratório. O primeiro, para avaliar a atividade da NR nos adubos verdes, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 4), sendo duas espécies de adubos verdes em função de quatro doses de molibdênio (0, 40, 80 e 120 g ha⁻¹), com três repetições, totalizando 24 unidades experimentais (UE). O segundo ensaio foi referente ao efeito residual das doses de Mo nos adubos verdes sobre o feijoeiro, em esquema fatorial (2x4)+1, sendo uma testemunha adicional, feijoeiro sem qualquer adubação, com três repetições, totalizando 27 UE.

No laboratório, tanto para o pré-teste quanto para as avaliações posteriores, seguiu-se a metodologia proposta por Jaworski (1971), a partir da qual calcula-se a atividade da enzima por meio da liberação de nitrito pelos tecidos vegetais em solução, que por sua vez é calculada por meio de curva padrão. Foram utilizadas a massa de 0,5 g de folhas recém-colhidas, cortadas em tamanho de aproximadamente 2 mm. A atividade da NR foi obtida em mmol NO²⁻ h⁻¹ g⁻¹ de MF (matéria fresca de folhas).

Os dados foram avaliados por meio de análise da variância (ANOVA) pelo teste F e regressão ($p \leq 0,05$), sendo os modelos selecionados pelo critério do

maior R^2 e a significância dos parâmetros, utilizando-se o software ASSISTAT (SILVA & AZEVEDO, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar a atividade da enzima nitrato redutase (NR) verificou-se a interação entre as espécies e as porções (terço inferior, médio e superior) da parte aérea dos adubos verdes (*Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis*). No entanto, não houve diferença estatística entre as porções dentro de cada espécie (Tabela 1). Esses resultados indicam que para ambos os adubos verdes, qualquer porção de suas partes aéreas podem ser utilizados para avaliação da NR.

O feijão-de-porco apresentou valores superiores para a NR nos terços superiores e médio em comparação a crotalária. No entanto, apesar de não existir diferença significativa, podem haver diferenças biológicas, já que os valores obtidos podem significar diferenças na atividade da enzima, principalmente em tecidos mais jovens (terço superior e médio) da planta, em relação ao terço inferior, apresentaram valores numéricos maiores para o feijão-de-porco.

Já para a espécie de crotalária-juncea, no campo foram constatadas sérias infestações de oídio (*Erysiphe cichoraceum*), o que acarretou na desfolha principalmente da parte aérea superior dessas plantas, prejudicando principalmente a capacidade fotossintética, levando a uma maior atividade da NR, numericamente, no terço inferior.

Tabela 1. Valores médios da NR em $\text{mmol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de MF nos adubos verdes *Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis* em relação as porções (terço inferior, médio e superior) da parte aérea dos adubos verdes. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).

Espécies	Terços		
	Superior	Médio	Inferior
Crotalária-juncea	0,05 Ab	0,04 Ab	0,10 Aa
Feijão-de-porco	0,17 Aa	0,16 Aa	0,11 Aa

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na avaliação da NR nos adubos verdes, verificou a interação entre as espécies e as doses de Mo. Ambas as espécies apresentaram um comportamento

quadrático em função das doses de Mo aplicadas (Figura 1). O feijão-de-porco apresentou um efeito negativo, onde as doses 0 e 120 g ha⁻¹ de Mo foram as que indicaram maior atividade, já a crotalária apresentou um efeito positivo, com máxima de 1,36 mmol NO²⁻ h⁻¹ g⁻¹ de MF na dose correspondente a 72,5 g ha⁻¹.

A aplicação de Mo não teve influência na atividade da NR no feijão-de-porco. Provavelmente, esta espécie possui um alto teor deste microelemento nas sementes, onde a adubação molíbdica não proporcionou resultados significativos. O feijão-de-porco possui como característica uma maior semente, principalmente quando comparada à de crotalária-juncea.

Esse comportamento também pode ser atribuído ao avançado estado de desenvolvimento em que o feijão-de-porco encontrava-se, ou seja, na fase de formação de vagem com eventuais botões florais, enquanto as plantas de crotalária-juncea, por serem plantas de dias curtos, encontravam-se, ainda, em crescimento vegetativo pelos estímulos da duração do dia (fotoperíodo), desta maneira respondendo à aplicação do Mo.

A tendência é um decréscimo na ANR na fase reprodutiva, a planta recruta nutrientes para a formação de grãos (PESSOA et al., 2000), com isso a atividade enzimática tende a diminuir drasticamente, fato que pode ter acarretado tal comportamento nas plantas de feijão-de-porco.

Figura 1. Atividade da Nitrato Redutase (NR) em adubos verdes sob doses de molibdênio aos 90 dias após a semeadura. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).

Para a atividade da NR no feijoeiro ocorreu a interação entre as espécies de adubos verdes e as doses de Mo. Quando analisado o efeito residual das doses de Mo aplicadas nos adubos verdes sob a atividade da NR no feijoeiro, verificou-se uma resposta quadrática negativa para ambas as sucessões (Figura 2). O feijoeiro apresentou maior NR nas parcelas onde não ocorreram as aplicações de Mo.

Em estudos com doses crescentes de Mo no feijoeiro Pessoa et al. (2001), obtiveram valores da NR bem superiores aos encontrados no presente estudo. No entanto, esses mesmos autores, avaliando a atividade desta enzima em

diferentes estádios fenológicos, demonstraram que a mensuração da atividade enzimática nas plantas que não receberam adubação molíbdica, foi maior na primeira coleta (aos 20 dias após a emergência), mas que com o decorrer do tempo esses valores diminuíram.

No momento da coleta das folhas, as plantas de feijoeiro encontravam-se a partir do estágio R7 (FANCELLI; DOURADO NETO, 1997), no início da formação de vagens. Esse fato, pode ter influenciado os resultados da NR, onde a atividade da enzima diminui na fase de enchimento de grãos, haja vista que ocorre uma menor absorção do nitrato do solo, pois, a translocação da seiva elaborada é voltada para as vagens com início de enchimento de grãos (HUNGRIA et al., 1985).

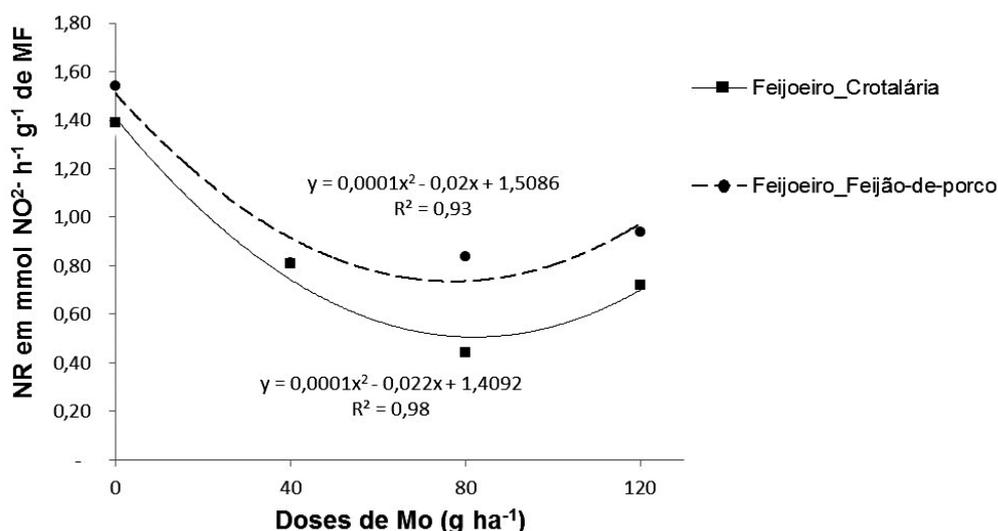


Figura 2. Atividade da Nitrato Redutase (NR) no feijoeiro em função da adubação verde e doses de Mo aos 66 dias após a semeadura. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).

Comparando o efeito residual dos adubos verdes e as doses aplicadas de Mo sobre o feijoeiro com a testemunha (feijoeiro sem qualquer adubação adicional), verifica-se que a atividade da NR em feijoeiro cultivado após ambas as espécies de adubos verdes com 0 g ha⁻¹ de Mo, bem como de feijão-de-porco com 120 g ha⁻¹, foram superiores à testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios da atividade da Nitrato Redutase (NR) no feijoeiro sobre o efeito residual dos adubos verdes *Crotalaria juncea* e *Canavalia ensiformis* sob as doses de Mo (0, 40, 80 e 120 g ha⁻¹) em comparação com a testemunha de feijoeiro. Pato Branco – PR, UTFPR, (2015).

Tratamentos	NR, em mmol NO ²⁻ h ⁻¹ g ⁻¹ de MF
Feijoeiro_Crotalária 0	1,39 *
Feijoeiro_Crotalária 40	0,81
Feijoeiro_Crotalária 80	0,44
Feijoeiro_Crotalária 120	0,72
Feijoeiro_Feijão-de-porco 0	1,54 *
Feijoeiro_Feijão-de-porco 40	0,81
Feijoeiro_Feijão-de-porco 80	0,84
Feijoeiro_Feijão-de-porco 120	0,94 *
Testemunha	0,52
CV(%)	16,50

Médias seguidas de * na coluna diferem da testemunha a 5% de probabilidade de erro pelo teste Dunnett.

6 CONCLUSÕES

O feijão-de-porco apresentou maior atividade da NR nos terços superiores e médio em comparação à crotalária-juncea. Não houve diferença estatística entre as porções dentro de cada espécie.

A crotalária-juncea apresentou efeito quadrático positivo para a NR em relação as doses de Mo aplicadas e o feijão-de-porco apresentou efeito quadrático negativo.

O efeito residual da adubação verde e das doses de Mo sob a atividade da NR no feijoeiro apresentou uma resposta quadrática negativa para ambas as espécies.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste trabalho possibilitou verificar qual a influência das diferentes porções da parte aérea das plantas de crotalária-juncea e feijão-de-porco perante a atividade da NR. Outro fato relevante, é que como não se tem dados na literatura que informem a influência da aplicação do molibdênio especificamente nos adubos verdes, alguns fatores como a data de aplicação do Mo, estágio fenológico de avaliação da NR, podem ter interferido em alguns dos resultados.

Porém, além do exposto no trabalho, seria interessante a realização de mais estudos a fim de se averiguar a influência da aplicação de doses de Mo em diferentes estágios de desenvolvimento dos adubos verdes na atividade da NR. Concomitantemente, seria importante a realização da mensuração da atividade da enzima nitrogenase, já que ambas enzimas são diretamente influenciadas pelo molibdênio.

Outro fato a ser explorado, seria quanto a influência que essas plantas adubadas com molibdênio sofreriam se fossem inoculadas com as estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio específicas para cada espécie leguminosa.

REFERÊNCIAS

ABREU, Cleide Aparecida et al. Micronutrientes. *In*: NOVAIS, R.F. et al. **Fertilidade do solo**. 1 ed. Viçosa: SBCS, 2007. p.645-724.

ALBUQUERQUE, Hermann Cruz de et al. Capacidade nodulatória e características agronômicas de feijoeiros comuns submetidos à adubação molíbdica parcelada e nitrogenada. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, v.43, n.2, p. 214-221, 2012.

BISCARO, Guilherme Augusto et al. Nitrogênio em cobertura e molibdênio via foliar no feijoeiro irrigado cultivado em solo de cerrado. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringa, v. 33, n. 4, p. 665-670, 2011.

CALONEGO Juliano Carlos, et al. Adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro com suplementação de molibdênio via foliar. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, v. 41, n. 3, p. 334-340, 2010.

FANCELLI, Antonio Luiz; DOURADO NETO, Durval. Ecofisiologia e fenologia do feijoeiro. *In*: Fancelli, A. L; Dourado Neto, D. (coord.). **Tecnologia da produção do feijão irrigado**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997. p.100-120.

GOMES, Marco Antônio Ferreira et. al. **Nutrientes vegetais no meio ambiente: ciclos bioquímicos, fertilizantes e corretivos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 62 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos; 66).

HUNGRIA, Mariangela. et al. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da nitrato redutase e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, v. 9, n. 3, p. 193-200, 1985.

HUNGRIA Mariangela; VARGAS Milton A.T. Environmental factors impacting N₂ fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**. v.65, n.1, p. 151-164, 2000.

JAWORSKI, E. K. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. New York, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431p.

KUBOTA, Flavio Yuudi et al. Crescimento e acumulação de nitrogênio de plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de molibdênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v.32, n.4, p.1635-1641, 2008.

MATOSO, Stella C. G.; KUSDRA Jorge F. Nodulação e crescimento do feijoeiro em resposta à aplicação de molibdênio e inoculante rizobiano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.18, n.6, p.567–573, 2014.

MOREIRA, Fátima M.S.; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA. 2006. 729p.

NEWBOULD, P. Principles of nutrient cycling. In: FRISSEL, M. J. (Ed.). **Cycling of mineral nutrients in agricultural ecosystems**. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 3-6.

PERIN, Adriano et al. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.39, n.1, p.35-40. 2004.

PESSOA, Antonio Carlos dos Santos et al. Concentração foliar de molibdênio e exportação de nutrientes pelo feijoeiro "Ouro Negro" em resposta à adubação foliar com molibdênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 24, n. 1, p. 75-84, 2000.

PESSOA, Antonio Carlos dos Santos et al. Atividades de nitrogenase e redutase de nitrato e produtividade do feijoeiro "Ouro Negro" em resposta à adubação foliar com molibdênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 24, p. 217-224, 2001.

REIS, Verônica Massena; TEIXEIRA Katia Regina dos Santos. Capítulo 6: Fixação Biológica de Nitrogênio – Estado da Arte. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed.). **Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Embrapa Agrobiologia. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368p.

REIS Verônica Massena; JÚNIOR Paulo Ivan Fernandes. **Algumas Limitações à Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas**. Documentos 252. Embrapa Agrobiologia. Seropédica-RJ. 2008. p.33. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embra>

pa.br/digital/bitstream/CNPAB2010/35748/1/doc252.pdf>. Acesso em 02 de nov. de 2015.

SILVA, Francisco de A. S.; AZEVEDO, Carlos A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v.4, n.1, p. 71-78, 2002.

SOUZA, Sonia Regina; FERNANDES, Manlio Silvestre. In. Capítulo: X-NITROGÊNIO. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. 432p.

TAIZ, Lincon; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. Tradução: DIVAN JUNIOR, Armando Molina et al. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 918p.

TOLEDO, Mariana Z. et al. Nodulação e atividade da nitrato redutase em função da aplicação de molibdênio em soja. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 858-864, 2010.

VARGAS, Thiago de Oliveira et al. Production of cabbage grown in pots containing legumes' root and shoot. **Revista Ceres**. v. 59, n. 5, p. 689-694, 2012.

YAMADA, Tsuioshi et al. **Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: IPNI(International Plant Nitrition Institute), 2007. p. 722.