



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

Alana Juliete da Silva Santos

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA REDUTASE DO
NITRATO EM MANGUEIRA CV. PALMER CULTIVADA NO VALE
DO SÃO FRANCISCO

Petrolina- PE

2019

ALANA JULIETE DA SILVA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA REDUTASE DO
NITRATO EM MANGUEIRA CV. PALMER CULTIVADA NO VALE
DO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto
Coorientador: Dr. Ítalo Herbert Lucena Cavalcante

Petrolina- PE

2019

237c Santos, Alana Juliete da Silva
Caracterização da atividade da redutase do nitrato em
mangueira cv. Palmer cultivada no Vale do São Francisco / Alana
Juliete da Silva Santos. - Petrolina, 2019.
79 f. il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) -
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências
Agrárias, Petrolina - PE, 2019.
Orientador: Prof. Dr. Ítalo Herbert Lucena Cavalcante.

Referências.

1. Manga. 2. Manga - Cultivo. 3. Nitrogênio. I. Título. II.
Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 634.34

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

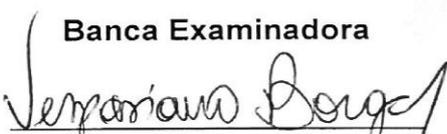
Alana Juliete da Silva Santos

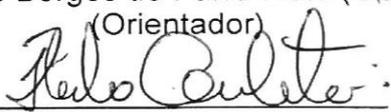
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO
EM MANGUEIRA CV. PALMER CULTIVADA NO VALE DO SÃO
FRANCISCO

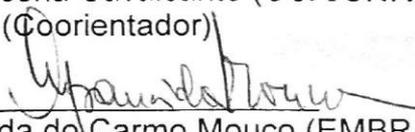
Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em
Agronomia – Produção Vegetal,
pela Universidade Federal do
Vale do São Francisco.

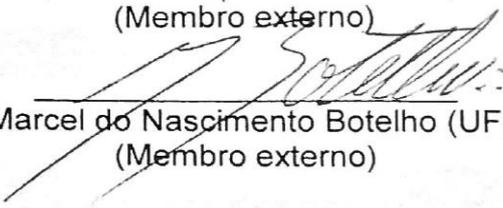
Aprovada em: 31 de Julho de 2019.

Banca Examinadora


Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto (CCA/UNIVASF)
(Orientador)


Dr. Ítalo Herbert Lucena Cavalcante (CCA/UNIVASF)
(Coorientador)


Dr^a. Maria Aparecida do Carmo Mouco (EMBRAPA)
(Membro externo)


Dr. Marcel do Nascimento Botelho (UFRA)
(Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter cuidado de mim em todo o tempo, por ter me fortalecido e sempre ter me orientado nas escolhas. Pela saúde e capacidade pra chegar aonde cheguei.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia- Produção vegetal (PPGA-PV) pela oportunidade de realização do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo para realização da pesquisa.

As fazendas FRUTAVI/ARGO e Sebastião da manga pela parceria e disponibilidade do campo para estudo.

Aos meus pais, Ângela Maria e Belarmino Francisco, que confiaram em mim e me apoiaram em tudo, que nunca me deixaram faltar nada essencial e me enchem todos os dias de conselho, proteção e amor. Obrigada pela base familiar que vocês me deram!

Ao meu namorado, Wendel Júnior, pelo companheirismo, incentivo e dedicação, por ter me ajudado durante esse processo e por ter sido compreensivo nos momentos em que precisei me ausentar. Você foi minha calma durante esse tempo!

Aos dois irmãos que o mestrado me deu, Luciana Sanches e Daniel Carreiro. Vocês poderiam ter sido apenas companheiros de trabalho, mas se tornaram meus companheiros de vida. Por nunca terem me deixado na mão e por sempre terem me dado a garantia de que eu não estaria sozinha. Por todos os momentos de alegria e crescimento que vocês me proporcionaram, por tudo, muito obrigada!

Às minhas amigas, em especial Iasmin Oliveira, Eduarda Vilela, Fernanda Oliveira, Priscilla Maria e Samile Santos, por me animarem e acreditarem em mim, sem cobrança e com paciência. Mesmo distantes se fizeram presentes com cada palavra de ânimo, cuidado e consolo.

Aos colegas de turma Vagner Pereira, Allan Marques e Vanuza de Souza pelo apoio quando necessário. Em especial a Kátia Araújo, minha parceira de estudo e amiga pra vida, sempre presente e me ajudando em tudo.

Aos colegas e amigos do grupo FRUTVASF, Jenilton Gomes, Poliana Martins, Luan Silva, Jackson Teixeira, Jasmine Sena, Jayne Lino, Laiane Eugênia e Stefany Rodrigues que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho, principalmente com as atividades em campo e laboratoriais. A contribuição de vocês foi essencial para que tudo desse certo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto, pelos ensinamentos, confiança, palavras de encorajamento e motivação. Por acreditar em mim e me proporcionar crescimento pessoal e profissional.

À Mônica Cristina Rezende Zuffo Borges, pelos ensinamentos em laboratório, paciência e disponibilidade sempre que eu precisei.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Ítalo Herbert Lucena Cavalcante, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para que essa etapa fosse concluída com sucesso, muito obrigada!

RESUMO

O nitrogênio (N) é um dos macronutrientes mais requeridos para a cultura da mangueira (*Mangifera indica* L.). Quando absorvido na forma de nitrato (NO_3^-) são necessários processos redutivos para posterior assimilação em compostos orgânicos. A primeira etapa do processo de redução é catalisada pela redutase do nitrato (RN), enzima chave na regulação do metabolismo de N. Devido o seu papel regulador, a RN é indiretamente correlacionada com a produtividade das culturas. Diante disso, o trabalho teve como objetivos avaliar a variação da atividade da redutase do nitrato (aRN) ao longo do dia, verificar as melhores condições para o ensaio e fazer a caracterização da atividade da enzima em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira, cultivada no Vale do Submédio São Francisco, em diferentes fases fenológicas, visando entender como a planta modula a redução do nitrato ao longo do seu ciclo vegetativo/reprodutivo. O material vegetal foi coletado em plantas dispostas aleatoriamente, em pomar comercial de mangueira, localizado em Petrolina-PE e Maniçoba, distrito de Juazeiro-BA. A quantificação da atividade da redutase do nitrato (aRN) baseou-se no método do ensaio in vivo. Para a triagem dos fatores foi utilizado o planejamento fatorial completo 2⁴. Para a caracterização, os dados foram submetidos a ANOVA pelo teste 'F' e as médias comparadas pelo teste de Tukey. A atividade da redutase do nitrato é influenciada por fatores ambientais, principalmente pela radiação solar. Para a obtenção da maior atividade da enzima em tecidos foliares e radiculares, recomenda-se a coleta do material vegetal em torno das 10 horas. Os fatores avaliados não atuam de forma independente. A condição que favorece a obtenção da maior atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens é pH 8,5, n-propanol 1% e 50 mM de nitrato de potássio (KNO_3). O melhor tempo de incubação em folhas é 60 minutos e em raízes 45 minutos. As folhas de 2º fluxo e raízes constituem os principais sítios de assimilação de NO_3^- na cultura da mangueira, podendo haver modulação em função da adubação com fonte de nitrato nas diferentes fases fenológicas. A atividade da enzima foi maior na fase vegetativa do que na reprodutiva e foi favorecida pela aplicação de potássio usado na maturação de ramos e desenvolvimento do fruto.

Palavras-chave: *Mangifera indica*. Nitrogênio. Atividade enzimática.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is one of the most requested macronutrients for mango trees (*Mangifera indica* L.). When absorbed as nitrate (NO_3^-), reductive processes are required for further assimilation into organic compounds. The first step of the reduction process is catalyzed by nitrate reductase (NR), an essential enzyme for the regulation of N metabolism. Due to its regulatory function, NR is indirectly correlated with crop yield. The aim of this study was to evaluate the variation of nitrate reductase activity (NRa) throughout the day, to verify the best conditions for the test and to characterize the enzyme activity in first and second flow leaf and young roots of mango trees grown in the sub-middle São Francisco Valley, in different phenological phases, in order to comprehend how the plant modulates the nitrate reduction throughout its vegetative/reproductive cycle. The vegetal sample was collected in plants randomly cultivated in a commercial orchard of mango located in Petrolina-PE and Maniçoba (district of Juazeiro-BA). The quantitation of nitrate reductase activity (NRa) was based on the *in vivo* method. For factor screening, it was done using a complete factorial design 2^4 . For the characterization stage, the data were submitted to ANOVA by the 'F' test and the means were compared by the Tukey test. Nitrate reductase activity is influenced by many environmental factors, mainly by solar radiation. To obtain the highest activity of the enzyme in leaf and root tissues, it is recommended to collect the vegetal samples at around 10 o'clock. The factors evaluated do not act independently. The condition that promotes the highest nitrate reductase activity in second flow leaf, first flow leaf and roots is pH 8,5, n-propanol 1% and 50 mM of potassium nitrate (KNO_3). The best incubation time for leaf is 60 minutes and for roots is 45 minutes. Second flow leaf and roots are the main sites for assimilation of NO_3^- in the mango trees and could be modulated as a function of fertilization with a source of nitrate in the different phenological phases. The activity of the enzyme was higher in the vegetative than in the reproductive phase and it was increased by the application of potassium used in fruit maturation and fruit development.

Keywords: *Mangifera indica*. Nitrogen. Enzymatic activity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Esquema do manejo da floração em mangueira (*Mangifera indica* L.) em condições semiáridas. 18

Capítulo 2

Figura 1. Curva de calibração para estimar a atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens em mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer. 34

Figura 2. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2⁴ obtido para a atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em folhas de 2º fluxo vegetativo de mangueira (*Mangifera indica* L.) (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança). 35

Figura 3. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2⁴ obtido para a atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em folhas de 1º fluxo vegetativo de mangueira (*Mangifera indica* L.) (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança). 36

Figura 4. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2⁴ obtido para a atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança). 36

Figura 5. Gráfico de efeitos do planejamento fatorial completo 2⁴ da interação entre os fatores tempo de incubação, n-propanol e KNO₃ para folhas de 2º fluxo (A) e raízes (B) de mangueira (*Mangifera indica* L.). 40

Figura 6. Gráfico de efeitos do planejamento fatorial completo 2⁴ da interação entre os fatores tempo de incubação, KNO₃ e pH para folhas de 2º fluxo (A) e raízes (B) de mangueira (*Mangifera indica* L.). 41

Figura 7. Gráfico de efeitos das interações duplas do planejamento fatorial completo 2⁴ entre os fatores KNO₃ e N-prop (A), tempo de incubação e N-prop (B); KNO₃ e pH (C) para folhas de 1º fluxo de mangueira (*Mangifera indica* L.). 43

Figura 8. Gráfico de quadrado das interações duplas do planejamento fatorial completo 2⁴ entre os fatores KNO₃ e N-prop (A), tempo de incubação e N-prop

(B); KNO ₃ e pH (C) para folhas de 1º fluxo de mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.).	45
Figura 9. Gráfico de cubo do planejamento fatorial completo 2 ⁴ para a interação entre os fatores tempo de incubação, KNO ₃ e pH em folhas de 2º fluxo (A) e raízes (B) de mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.).	46
Figura 10. Gráfico de cubo do planejamento fatorial completo 2 ⁴ para a interação entre os fatores tempo de incubação, n-propanol e KNO ₃ em folhas de 2º fluxo (A) e raízes (B) de mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.).	47

Capítulo 3

Figura 1. Detalhe das folhas de mangueira de 1º e 2º fluxo vegetativo coletadas para a quantificação da atividade da enzima redutase do nitrato. ...	58
Figura 2. Variação diurna da atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer.	59
Figura 3. Valores médios de radiação solar obtidos da estação meteorológica da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), <i>Campus</i> de Ciências Agrárias (CCA), em diferentes dias e fases fenológicas da mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.).	60
Figura 4. Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de mangueira cv. Palmer nas fases de pré-poda e poda, nos dias 14/04/2019 e 29/04/2019 respectivamente, na área 1 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-PE.	61
Figura 5. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer aos 12 e 32 dias após a aplicação de paclobutrazol, no dia 22/01/2019, nas áreas 3 e 4, respectivamente, da fazenda Francês em Maniçoba-BA.	63
Figura 6. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer na fase de maturação de ramos um dia após a segunda aplicação de sulfato de potássio (K ₂ SO ₄), 14/12/2019, na área 2 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-PE.	65
Figura 7. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer nas fases de pré-indução e indução floral, dia 08/01/2019 e 15/01/2019 respectivamente, na área 2 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-Pe.	67

Figura 8. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 2 ^o e 1 ^o fluxo vegetativo e raízes de mangueira cv. Palmer na fase de floração plena, dia 23/02/2019, na área 2 da fazenda de Sebastião da manga em Petrolina-Pe.	69
Figura 9. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1 ^o e 2 ^o fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer na fase de frutificação, dia 18/04/2019, na área 2 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-Pe.	70
Figura 10. Atividade total da redutase do nitrato em mangueira cv. Palmer nas diferentes fenofases.	71

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1.** Níveis mínimos (-1) e máximos (+1) dos fatores estudados na quantificação da atividade da redutase do nitrato (aRN) em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer. 32
- Tabela 2.** Matriz com Planejamento Fatorial completo 2^4 , com 2 níveis e 4 fatores, para a quantificação da atividade da redutase do nitrato (aRN) em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer. 33
- Tabela 3.** Síntese da análise de variância para folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens (material vegetal) de mangueira cv. Palmer em diferentes tempos de incubação. 48

Capítulo 3

- Tabela 1.** Informações gerais referentes às áreas estudadas. 56
- Tabela 2.** Fenofases da cultura da mangueira objeto da coleta de material para análises de atividade da enzima redutase do nitrato e respectivos locais de coleta de folhas e raízes. 57

Anexo

- Tabela 1.** Síntese da análise de variância para folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens (material vegetal) de mangueira cv. Palmer nas diferentes fenofases. 79

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1	13
INTRODUÇÃO	13
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
A cultura da mangueira	14
Metabolismo do nitrogênio (N)	19
A redutase do nitrato (RN).....	21
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2	29
VERIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA ANÁLISE DA REDUTASE DO NITRATO EM MANGUEIRA (<i>Mangifera indica</i> L.).....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 3	53
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO NAS DIFERENTES FENOFASES DE MANGUEIRA CV. PALMER CULTIVADA NO VALE DO SÃO FRANCISCO.....	53
RESUMO.....	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	72
ANEXO	79

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A mangicultura na região semiárida se destaca por diversos motivos, dentre eles as condições climáticas que, associadas a podas e utilização de reguladores vegetais, possibilitam a produção de frutos em qualquer época do ano (MOUCO, 2008). Para manter uma boa produtividade na região, é feito o manejo da mangueira com o uso de reguladores de crescimento, podas e adubação.

Na cultura da mangueira o crescimento vegetativo é determinante para a produção, de modo que quanto maior o número de brotos vegetativos, maior a chance de ocorrência de panículas e frutificação. No semiárido nordestino, devido às condições de elevadas temperaturas, é indispensável se trabalhar com ramos maduros, com no mínimo três meses de idade, no processo de indução floral (ALBUQUERQUE et al., 2002). Nesse caso, após a colheita, recomenda-se ao produtor de manga estimular a emissão de novos fluxos vegetativos mediante poda, manejo nutricional e irrigação, a fim de possibilitar o amadurecimento dos brotos gerados a partir da poda (MOUCO, 2008), pois é clara a importância dessa maturação de ramos em plantas com fins comerciais no semiárido (CAVALCANTE et al., 2018).

O estado nutricional da planta é outro fator importante que afeta a floração em mangueira, portanto, o manejo da adubação, principalmente para potássio (K), enxofre (S) e nitrogênio (N), é crucial durante a fase de maturação de ramos (CAVALCANTE et al., 2018). O N é um dos nutrientes mais absorvidos, com efeito direto na distribuição de fotoassimilados entre a parte vegetativa e reprodutiva, modificando a fisiologia e morfologia da planta, estando relacionado com a fotossíntese, crescimento radicular, absorção iônica de nutrientes e desenvolvimento celular (QUEIROGA et al., 2007). No momento da indução floral, os teores de N devem estar no limite médio inferior da oferta adequada, para garantir a fase reprodutiva em vez de fluxos vegetativos (DAVENPORT et al., 2003).

As duas principais formas de N encontradas na solução do solo são nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), porém, em solos tropicais, o nitrato é a principal forma de aquisição pelas plantas (MARSCHNER; MARSCHNER, 2012). Quando absorvido na forma nítrica, para ser utilizado é necessário ser reduzido

e assimilado em um processo dependente de energia e catalisado por enzimas (TAIZ; ZEIGER, 2017). Ao ser absorvido pelas raízes, o NO_3^- pode ser reduzido ou estocado nos vacúolos dos tecidos radiculares ou na parte aérea, para onde é translocado via xilema por meio do fluxo transpiratório (SANTOS, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2017). Na cultura da mangueira foi observada a redução do nitrato tanto na raiz quanto nas folhas (SOUZA et al., 2016).

A assimilação de nitrato é de importância biológica fundamental, sendo a principal via pela qual o nitrogênio é convertido na forma orgânica. A primeira etapa do processo se dá com a redução de NO_3^- a nitrito (NO_2^-), reação catalisada pela enzima redutase do nitrato (RN). A segunda etapa é a redução do NO_2^- a amônia (NH_3^+), catalisada pela enzima redutase do nitrito. O primeiro passo dessa reação é considerado o limitativo, tornando a redutase do nitrato um fator limitante para o crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas (CRAWFORD, 1995; SOLOMONSON; BARBER, 1990).

A RN é um complexo enzimático composto por duas unidades idênticas apresentando três grupos prostéticos cada, o FAD, o heme e a Molibdopterina. A enzima é regulada por diversos estímulos ambientais e intrínsecos à planta que regulam os mecanismos transcripcional, traducional e pós-traducional (CAMPBELL, 1999). A redutase do nitrato é considerada enzima chave na regulação do metabolismo de N. Por esse motivo, a sua atividade poderia estar relacionada, indiretamente, com a produtividade das culturas, considerando que plantas com alta atividade da redutase do nitrato (aRN) teriam maior capacidade de assimilar o nitrato disponível e maior capacidade de resposta à adubação nitrogenada (VIANA; KIEHL, 2010).

Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo verificar a atividade da redutase do nitrato em folhas de 1^o e 2^o fluxos e vegetativos e sistema radicular jovem em mangueira (*Mangifera indica* L.) cultivada no Vale do Submédio São Francisco, dada a escassez dessas informações na literatura.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A cultura da mangueira

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma fruta de origem asiática (CUNHA et al, 2002) que encontra, no Brasil, boas condições para o seu desenvolvimento e produção, concentrada em especial na Região Nordeste

(ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018). A possibilidade de produção o ano inteiro é o diferencial de maior interesse no cultivo da mangueira nas condições semiáridas. Para isso, deve-se realizar o manejo adequado da parte aérea de modo que favoreça a floração (MOUCO, 2010) e atentar para o manejo nutricional, pois, o atendimento adequado das exigências nutricionais faz com que as plantas frutíferas expressem todo o seu potencial genético (AULAR; NATALE, 2013).

A concentração de macronutrientes em mangueira varia durante os diferentes estádios fenológicos do ciclo de produção, como repouso (dormência), floração, frutificação, crescimento de frutos e colheita (ZUAZO et al., 2008; RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010). O nitrogênio é um dos nutrientes que tem grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas, pois participa de diversos compostos essenciais para o crescimento vegetativo e reprodutivo da mangueira (BALLY, 2009). López et al. (2012) estudaram a evolução de nutriente foliar em três diferentes cultivares de mangueira, no México, e observaram que o nitrogênio apresenta diferença no seu desempenho ao longo da vida da folha. Porém, nem sempre as mudanças nas concentrações de nutrientes estão associadas com eventos fenológicos.

As folhas jovens de mangueira apresentam maiores teores de nitrogênio em comparação com as folhas maduras. Isso pode ser atribuído ao efeito e concentração, pois, as folhas jovens ainda não estão totalmente expandidas. À medida que as folhas atingem a sua plenitude fisiológica, os teores de N se estabilizam em uma concentração menor, que tende a diminuir ainda mais próximo à senescência da folha, o que está relacionado com a remobilização (ALMEIDA et al., 2014).

Em condições tropicais o crescimento da mangueira tende a ser desuniforme, de modo que em uma planta, em diferentes partes da copa, podem apresentar flores, frutos e fluxo em repouso (DAVENPORT, 2009). Alguns procedimentos são eficazes para induzir uma florada uniforme, que pode ser estimulada por fatores ambientais, como a mudança de temperatura (RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010), ou por fatores antropogênicos como poda, irrigação, aplicação de fertilizantes nitrogenados e exposição ao etileno (DAVENPORT, 2009).

A sincronização do crescimento vegetativo das copas das mangueiras no pomar, bem conhecido como poda, é o primeiro passo necessário no programa de manejo da floração. Esse trato cultural resulta num crescimento uniforme ao longo da planta e permite que os ramos estejam no mesmo estágio fisiológico de maturidade, tornando o manejo mais eficiente (DAVENPORT, 2003; RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010). É essencial que as plantas sejam bem irrigadas nesse momento da poda a fim de se obter uma rápida resposta na brotação, pois, qualquer estresse hídrico nessa fase, por menor que seja, pode inibir o crescimento vegetativo (DAVENPORT, 2003).

As mangueiras podem produzir basicamente três tipos de brotos. Brotos vegetativos com apenas folhas; brotos generativos que possuem panículas terminais; e brotos mistos com folhas e inflorescências dentro dos mesmos nós (DAVENPORT, 2007, 2009; SANDIP et al., 2015). A profundidade da poda, o manejo de nitrogênio foliar e manejo da água são três fatores importantes que determinam a ocorrência ou não de um segundo fluxo indesejável. Esses fatores interagem para promover ou evitar uma segunda emissão de broto vegetativo (DAVENPORT, 2003).

Plantas que receberam a poda de uniformização desenvolveram gemas e panículas florais uniformemente por todo o dossel, enquanto que nas plantas que não foram podadas foi observado um florescimento irregular, com presença de gemas florais, panículas em desenvolvimento e panículas com abertura floral na mesma planta (OLIVEIRA et al., 2017). De acordo com esses autores, a poda associada com a aplicação de paclobutrazol (PBZ) favorece um maior número de panículas por ramo e uma maior porcentagem de floração.

O PBZ é um triazol que reduz os níveis do promotor vegetativo (PV). Acredita-se que esse promotor seja uma giberelina (DAVENPORT, 2003; UPRETI et al., 2013), nesse caso, o PBZ inibe a biossíntese de giberelinas. O declínio consistente do PV com aumento nas citocininas e ácido abscísico, em combinação com carboidratos suficientes acumulados nas gemas, favorecem induções florais em mangueira (SANDIP et al., 2015). O produto deve ser depois da emissão de pelo menos dois ramos/fluxos vegetativos (MOUCO, 2015). Essa aplicação induz mudanças na fisiologia da planta, como a melhoria na absorção de nutrientes, realocação rápida de fotoassimilados, aumento da

relação C:N, equilíbrio hormonal e alteração no balanço hídrico (UPRETI et al., 2013), promovendo assim a maturação dos ramos (TAIZ; ZEIGER, 2017).

No manejo da floração, são realizadas pulverizações com sulfato de potássio (2% a 2,5%) após 30 dias da aplicação do PBZ, para conter a emissão de ramos vegetativos, participando do processo de maturação dos ramos (MOUCO, 2015). As brotações vegetativas sofrem alterações distintas desde o início do desenvolvimento até a maturação. Inicialmente os ramos são de cor verde clara. Mais ou menos duas semanas após adquirem coloração avermelhada e pouca lignificação. Após dois meses está com uma lignificação maior e uma coloração verde escura, aspecto de um ramo maduro. As folhas acompanham a maturação do ramo (SANDIP et al., 2015).

O estresse hídrico reduz as porcentagens de crescimento vegetativo, a área foliar da mangueira e o período entre a plena floração e maturidade em consequência do seu efeito significativo na redução da concentração de N (HELALY et al., 2017). Esse manejo não é capaz de induzir a floração quando realizado independentemente. No entanto, a idade do último fluxo impactado pela duração do estresse é o que impulsiona esse evento, que evita a iniciação da parte aérea e mantém a planta em repouso até que ocorra o acúmulo de idade nas folhas e ocorra o florescimento devido à redução do promotor vegetativo (PV), que depende da idade foliar (RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010).

Após os brotos alcançarem a maturidade prossegue com a indução floral (RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010; JAMEEL et al., 2018), que é a pulverização via foliar com sais de nitrato para estimular a brotação reprodutiva, somente se as gemas estiverem diferenciadas. As aplicações devem ser feitas em períodos do dia com temperaturas mais amenas. Deve-se atentar bem ao tempo certo de iniciar a indução floral, tomando como base a idade dos ramos, o teor de N e observando o efeito da temperatura, pois, ao iniciar mais cedo o resultado é broto vegetativo ao invés de flores. Porém, se as plantas estiverem prontas para receber o estímulo, em um período de dez dias é possível ver brotos florais (DAVENPORT, 2003; DAVENPORT, 2007).

O KNO_3 induz a atividade da redutase do nitrato (RN), enzima chave na via de assimilação de nitrato para a síntese de aminoácidos, em particular a metionina (ANUSUYA et al., 2018), que promove o florescimento na mangueira e é precursor do etileno (SUDHA et al., 2012). Esses autores registraram maior

teor de N em plantas tratadas com KNO_3 em comparação ao uso de uréia, NH_4NO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, o que pode melhorar a floração, frutificação e rendimento em cultivares de manga.

Na figura 1 estão representadas as diferentes fases do manejo da floração em mangueira no Semiárido brasileiro. Como visto, o manejo inicia com a poda de produção após a colheita. Depois da brotação de no mínimo dois fluxos vegetativos faz a aplicação do PBZ. Aos 30 dias do PBZ iniciam as pulverizações com sulfato de potássio (em torno de três) e aos 80 dias pode ser feita a redução da lâmina de água. As pulverizações com uma das fontes de nitrato devem ser iniciadas quando os ramos se apresentarem maduros para dar início ao florescimento dos ramos e à produção de frutos (MOUCO, 2015).

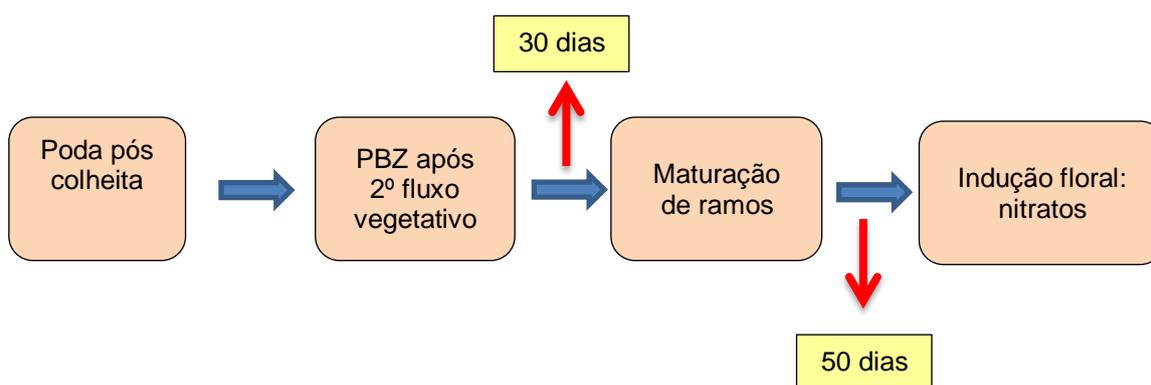


Figura 1. Esquema do manejo da floração em mangueira (*Mangifera indica* L.) em condições semiáridas.

Existe um promotor florigênico (PF) em folhas de mangueira em níveis regidos pela temperatura, que é translocado via floema para gemas apicais e induz a floração (DAVENPORT, 2009; RAMÍREZ et al., 2010). Alta taxa de PF/PV favorece a indução floral, baixa taxa PF/PV favorece crescimento vegetativo e razões intermediárias favorecem brotos mistos. Em condições quentes, para induzir a floração, os níveis de PV devem cair para níveis suficientemente baixos para aumentar a razão PF/PV (SANDIP et al., 2015). Temperatura máxima superior a 30°C e mínima superior a 25°C favorece o crescimento vegetativo, enquanto que temperaturas variando entre 18°C (mínima) e 28°C (máxima) induzem o florescimento (LIMA FILHO et al., 2002).

Nos trópicos, a idade do último fluxo é o fator dominante que regula a floração (DAVENPORT, 2007).

Durante a fase de floração o teor de N diminui, provavelmente devido à atividade enzimática e à síntese de hormônios que estimularam a produção de carboidratos necessários para a divisão e alongamento celular para os novos brotos (ZUAZO et al., 2008). Costa et al. (2011) observaram também que nas folhas de mangueira os maiores teores de N ocorrem antes da floração, e que na plena floração e formação de frutos, os níveis desse nutriente são mais baixos. Galli et al. (2009) encontraram teores excessivos de N em folhas de mangueira na fase vegetativa, decrescendo nas fases seguintes. Urban et al. (2004) ao estudarem o efeito inibitório da floração e crescimento do fruto na fotossíntese foliar de mangueira, observaram que o teor foliar de N por unidade de massa foi diminuindo do início até o final da fase de floração, tanto em folhas de brotos vegetativos quanto nas folhas próximas às inflorescências.

Resultados diferentes podem ser encontrados na literatura. Faria et al. (2016) observaram, em folhas de mangueira cv. Tommy Atkins, maior conteúdo de N na fase de floração. Esse resultado pode ser devido às aplicações de nitrato de cálcio para o manejo da indução floral que favoreceram as altas concentrações do nutriente. Medeiros et al. (2004) também relatam que os teores foliares de N são maiores no florescimento do que nas outras fases fenológicas da cultura da manga.

A análise foliar baseia-se na premissa de que a folha é altamente sensível à disponibilidade de nutrientes no solo, de modo a refletir os efeitos líquidos da profundidade do solo, implicações das interfaces raiz-solo, translocação e condições fisiológicas, sendo assim considerado o centro da atividade fisiológica das plantas (RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010). Esses autores afirmam que conhecer o teor de nutriente foliar é valioso para determinar as exigências nutricionais da planta e estabelecer a fertilização ideal no estágio específico de desenvolvimento.

Metabolismo do nitrogênio (N)

O nitrogênio (N) é essencial para a síntese de proteínas nas plantas e a deficiência desse elemento pode comprometer o complexo enzimático do vegetal (CARNEIRO et al., 2015). Além da função estrutural, o N atua como sinalizador para a transcrição de genes específicos relacionados com a sua

absorção, transporte e assimilação, bem como para o balanço hormonal endógeno de auxinas e citocininas, que atuam no crescimento e desenvolvimento vegetal (MILLER et al., 2007; GARNICA et al., 2010).

A concentração de N no solo é reduzida, por outro lado o N atmosférico é abundante, mas não está prontamente disponível para absorção pelas plantas, precisa ser transformado nas formas inorgânicas para ser absorvido pelas vias radiculares. Os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) são as fontes de N mais disponíveis, sendo o NO_3^- a principal e maior fonte na maioria dos solos (MARSCHNER; MARSCHNER, 2012), porém, a preferência de absorção entre ambos pode variar de acordo com a espécie (SILVA, 2016). No entanto, uma maior concentração de N no solo não significa maior absorção do nutriente e síntese de proteína pelas plantas, pois, esses processos dependem de vários fatores como disponibilidade de C, energia, atividade de enzimas e condições climáticas como temperatura e chuva (FERREIRA et al., 2015).

O NO_3^- é absorvido ativamente via sistema simporte, com transporte simultâneo de dois H^+ e um NO_3^- para o interior da célula, com o custo energético de dois moles de ATP para cada mol de NO_3^- absorvido. A absorção do NH_4^+ ocorre passivamente via sistema uniporte, estando prontamente disponível para incorporação sem gasto de energia (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os vegetais assimilam a maior parte do NO_3^- em compostos orgânicos por meio de processos redutivos. A primeira etapa desse processo é a redução do NO_3^- a nitrito (NO_2^-), que ocorre no citosol e é catalisada pela enzima redutase do nitrato (RN) (DEBOUBA; DGUIMI; GHORBEL, 2013), que envolve a transferência de dois elétrons por meio do NAD(P)H ou NADH. Esse elemento é altamente reativo e potencialmente tóxico, sendo transportado para os cloroplastos nas folhas ou para os plastídios nas raízes. A segunda etapa do processo segue com a redução do NO_2^- a NH_4^+ . Essa reação é catalisada pela enzima nitrito redutase e envolve a transferência de seis elétrons, tendo a ferredoxina como cofator (SOLOMONSON; BARBER, 1990; KERBAUY, 2008; MARSCHNER; MARSCHNER, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2017).

O NH_4^+ , seja absorvido, advindo da assimilação do nitrato, ou da fotorrespiração, é incorporado em compostos orgânicos, glutamina e glutamato, por meio das enzimas Glutamina sintetase (GS) e Glutamato sintase (GOGAT), que translocam N orgânico entre as células fonte e dreno e geram todos os

demais compostos nitrogenados. O amônio também pode ser assimilado por uma rota alternativa através da enzima Glutamato Desidrogenase (GDH), que é ativada quando o NH_4^+ está em concentrações elevadas (KERBAUY, 2008; MARSCHNER; MARSCHNER, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2017).

A assimilação de NH_4^+ tem um menor gasto de energia metabólica em comparação com a assimilação de NO_3^- , com uma economia de 9%, visto que não requer a atividade da enzima RN. Em contrapartida, a assimilação de NO_3^- envolve uma transferência de dez prótons e oito elétrons (BRITTO; KRONZUCKER, 2002; FAGERIA, 2009).

O NO_3^- pode ser assimilado na raiz ou ser transportado para as folhas e ser assimilado na parte aérea (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Há relatos de aRN em tecido não fotossintetizante, no entanto, a redução do NO_3^- nas folhas é menos dispendiosa quando comparada com a redução na raiz. Os tecidos fotossintetizantes são locais mais adequados para esse evento, pois, os oito elétrons utilizados no processo completo de redução advém da fase fotoquímica da fotossíntese (MARTUSCELLO et al., 2016). Souza et al. (2016) observaram a redução do nitrato em folhas e raízes de mangueira (*Mangifera indica* L.) ao quantificarem a aRN nesses tecidos, sendo maior no tecido radicular. Oliveira et al. (2005) também observaram a atividade da enzima em folhas e raízes de *Bactris gasipaes*, porém maior atividade nas folhas.

O metabolismo de N é importante para a formação de aminoácidos e proteínas, essenciais para um maior desenvolvimento e produtividade das culturas. Portanto, faz-se necessário entender o processo de aproveitamento e assimilação desse nutriente com o objetivo de promover uma maior eficiência no uso de N no sistema solo-planta (VIANA, 2007).

A redutase do nitrato (RN)

A redutase do nitrato (RN) é a primeira enzima do metabolismo e assimilação do nitrogênio (N), catalisando a reação de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), e desempenha um importante papel na resposta das plantas à deficiência desse elemento (KICHEY et al., 2006, 2007; ANDREWS et al., 2013; KAUR et al., 2015). Além disso, a sua atividade determina a taxa de assimilação de NO_3^- em compostos orgânicos nitrogenados (LILLO, 2008;

HEIDARI et al., 2011), ou seja, baixa atividade da redutase do nitrato (aRN) indica baixa assimilação de N (MARTUSCELLO et al., 2016).

A RN em plantas superiores é constituída de duas subunidades idênticas, com três grupos prostéticos cada, sendo eles flavina adenina dinucleotídeo (FAD), heme e um complexo formado pelo molibdênio (Mo) e uma molécula orgânica chamada pterina (SOLOMONSON; BARBER, 1990; TAIZ; ZEIGER, 2017). Nos tecidos vegetais, esta enzima é a principal proteína que contém Mo, em consequência disso, a deficiência desse nutriente pode ocasionar o acúmulo de nitrato devido à redução da aRN (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Muitos fatores regulam a atividade da RN, como por exemplo, nitrato e potássio que induzem a sua atividade em mangueira, o que pode ser observado com a resposta da planta à aplicação de nitrato de potássio (KNO_3) (COUTINHO et al., 2016; ANUSUYA et al., 2018). Segundo Oliveira et al. (2005), a luz e o estado hídrico da planta também modelam a sua atividade. Guilherme et al. (2019) afirmaram o mesmo quanto à intensidade luminosa, considerando-a um fator regulador da aRN. Segundo Tanan (2019), em *Physalis angulata* L., nos períodos de maior radiação solar, ao longo do dia, ocorrem os picos de atividade da enzima na raiz, acontecendo o inverso na folha, sendo menor a atividade nesses mesmos momentos. Da mesma forma foi observado em folhas de café (*Coffea arabica* L.) por Queiroz et al. (1993), um declínio gradual da atividade da enzima no decorrer do período luminoso. Enquanto Santos et al. (2014) inferiam que em *Saccharum officinarum* L. a enzima é mais ativa nos horários de maior intensidade de radiação solar global e que os níveis mais baixos encontrados em condições de menor radiação solar podem estar ligados a um mecanismo de controle rápido da enzima. De um modo geral a atividade da enzima varia entre espécies de plantas, formas de crescimento e habitats, sendo menor para espécies lenhosas (RAJSZ et al., 2018).

A expressão dos genes da RN é rapidamente induzida em várias plantas na presença de nitrato (KONISHI; YANAGISAWA, 2011), pois, a síntese da enzima é induzida pelo próprio substrato, o que explica o aumento da sua atividade em maiores doses de N (MARTUSCELLO et al., 2016). O equilíbrio da redutase do nitrato é determinado pela sua taxa de síntese e

degradação. A meia vida da enzima recém sintetizada é de poucas horas na célula e, quando a concentração de nitrato no substrato diminui, a atividade da enzima também diminui rapidamente (TAIZ; ZEIGER, 2017).

A RN é considerada um fator limitante para o crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas em plantas que assimilam nitrato (SOLOMONSON; BARBER, 1990), pois, sem esta enzima, não ocorre a assimilação (KAUFHOLDT et al., 2016). Devido ao seu papel regulador, está correlacionada indiretamente com a produtividade das culturas, pressupondo que plantas com alta atividade dessa enzima teriam maior capacidade de assimilar o nitrato disponível e, conseqüentemente, maior capacidade de resposta à adubação nitrogenada (VIANA, 2007).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J. A. S. de; MEDINA, V. D.; MOUCO, M. A. do C. Indução floral. In: GENU, P. J. de C.; PINTO, C. A. de Q. (Ed.). **A cultura da mangueira**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. cap. 13, p.259-276.

ALMEIDA, C.X. de; PITA JÚNIOR, J.L.; ROZANE, D.E.; SOUZA, H.A. de; HERNANDES, A.; NATALE, W.; FERRAUDO, A.S. Nutrient cycling in mango tress. **Semina: Ciências agrárias**, v.35, n.1, p.259-266, 2014.

ANDREWS, M.; RAVEN, J.A.; LEA, P.J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, v.163, p.174 –199, 2013.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2018. 49p.

ANUSUYA, R.; VIJAYAKUMAR, R.M.; SRIVIDHYA, S.; SIVAKUMAR, R. Comparison of physiological and flowering parameters of main and off season by using different plant nutrients and growth hormone in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Bangalora. **Journal of Agriculture and Ecology**, v.5, p.76-82, 2018.

AULAR, J.; NATALE, W. Nutrição mineral e qualidade do fruto de algumas frutíferas tropicais: goiabeira, mangueira, bananeira e mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1214-1231, 2013.

BALLY, I.S.E. Crop production: mineral nutrition. In: LITZ, R. E. (Ed) **The mango: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2009. p. 404-431.

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

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p.567–584, 2002.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 277-303, 1999.

CARNEIRO, M.M.; GOMES, M.P.; SANTOS, H.R.; REIS, M.V. dos; MENDONÇA, A.M.D.C.; OLIVEIRA, L.E. de. Fotorrespiração e metabolismo antioxidante em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 66-73, 2015.

CAVALCANTE, Í.H.L.; SANTOS, G.N.F. dos; SILVA, M.A. da; MARTINS, R. dos S.; LIMA, A.M.N.; MODESTO, P.I.R.; ALCOBIA, A.M.; SILVA, T.R. de S.; AMARIZ, R.A. e; BECKMANN-CAVALCANTE, M.Z. A new approach to induce mango shoot maturation in Brazilian semi-arid environment. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 91, p. 281-286, 2018.

COSTA, M.E. da; CALDAS, A.V.C. e; OLIVEIRA, A. de F.M.; GURGEL, M.T.; SILVA, R.M. da. Caracterização nutricional da mangueira “Tommy Atkins” em função da adubação nitrogenada. **Agropecuária Científica no semi-árido**, v.7, n.1, p.16-22, 2011.

COUTINHO, G.; COSTA, I. de J.S.; PIO, L.A.S. **Indução floral em mangueira (*Mangifera indica* L.)**. Boletim técnico Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, n. 101, p. 1-22, 2016.

CUNHA, G. A. P.; PINTO, A. C. Q.; FERREIRA, F. R. Origem, dispersão, taxonomia e botânica. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q. **A cultura da mangueira**. 1ª ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.31-36.

CRAWFORD, N.M. Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 859-868, 1995.

DAVENPORT, T. L. Management of flowering in three tropical and subtropical fruit tree species. **HortScience**, v. 38, n. 7, p. 1331-1335, 2003.

DAVENPORT, T.L. Reproductive physiology of mango. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 363-376, 2007.

DAVENPORT, T.L. Reproductive physiology. In: Litz, R.E. (Ed.), **The Mango: Botany Production and Uses**, 2nd edition. CAB International, Wallingford, UK, p. 97-169, 2009.

DEBOUBA, M.; DGUIIMI, H.; GHORBEL, M. Expression pattern of genes encoding nitrate and ammonium assimilating enzymes in *Arabidopsis thaliana*

exposed to short term NaCl stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 2, p. 155-60, 2013.

DOVIS, V.L.; HIPPLER, F.W.R.; SILVA, K.I.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; MATTOS JUNIOR, D. Optimization of the nitrate reductase activity assay for citrus trees. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 383-390, 2014.

FAGERIA, N.K.; BARBOSA FILHO, M.P.; MOREIRA, A.; GUIMARÃES, C.M. Foliar fertilization of crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 1044-1064, 2009.

FARIA, L.N.; DONATO, S.L.R.; SANTOS, M.R. dos; CASTRO, L.G. Nutrient contents in “Tommy Atkins” mango leaves at flowering and fruiting stages. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural**, v.36, n.6, p.1073-1085, 2016.

FERREIRA, E.V. DE O.; NOVAIS, R.F.; SANTOS, F.A. DOS; RIBEIRO, C.; BARROS, N.F. Nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) can be used as indicators of nitrogen status in eucalyptus clones. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 6, p. 561, 2015.

GALLI, J.A.; SILVEIRA, L.C.P.; MICHELOTTO, M.D.; MARTINS, A.L.M. Avaliação da incidência de antracnose, do desempenho e estado nutricional de variedades de mangueira, para cultivo orgânico, na região centro-norte do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.3, p.701-709, 2009.

GARNICA, M.; HOUDUSSE, F.; ZAMARRENO, A.M.; GARCIA-MINA, J.M. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1264–1272, 2010.

GUILHERME, E.A.; CARVALHO, F.E.L.; DALOSO, D.M.; SILVEIRA, J.A.G. Increase in assimilatory nitrate reduction and photorespiration enhances CO₂ assimilation under high light-induced photoinhibition in cotton. **Environmental and Experimental Botany**, v. 159, p. 66-74, 2019.

HEIDARI, B.; MATRE, P.; NEMIE-FEYISSA, D.; MEYER, C.; ROGNLI, O.A.; MOLLER, S.G.; LILLO, C. Protein phosphatase 2AB55 and a regulatory subunits Interact with nitrate reductase and are essential for nitrate reductase activation. **Plant Physiology**, v.156, p.165-172, 2011.

HELALY, M.N.; EL-HOSEINY, H.; EL-SHEERY, N.I.; RASTOGI, A.; KALAJI, H.M. Regulation and physiological role of silicon in alleviating drought stress of mango. **Plant physiology and biochemistry**, v.118, pg.31-44, 2017.

JAMEEL, M.A.; NAIK, S.R.; MADHUMATHI, C.; REDDY, D.S.; VENKATARAMANA, K.T. Physiology of flowering in mango. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.7, n.6, p.2375-2382, 2018.

- KAUR, G.; ASTHIR, B.; BAINS, N. S.; FAROOQ, M. Nitrogen nutrition, its assimilation and remobilization in diverse wheat genotypes. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.17, n.3, p.531-538, 2015.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2. Ed. Guanabara Koogan, 2008. 472p.
- KAUFHOLDT, D.; BAILLIE, C.K.; MEYER, M.H.; SCHWICH, O.D.; TIMMERER, U.L.; TOBIAS, L.; THIEL, D.V.; HANSCH, R.; MENDEL, R.R. Identification of a protein-protein interaction network downstream of molybdenum cofactor biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, n.207, p.42–50, 2016.
- KICHEY, T.; HEUMEZ, E.; POCHOLLE, D.; PAGEAU, K.; VANACKER, H.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J.; HIREL, B. Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat highlight a central role for glutamine synthetase. **New Phytologist**, v.169, p.265-278, 2006.
- KICHEY, T.; HIREL, B.; HEUMEZ, E.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlate with agronomic traits and nitrogen physiological markers. **Field Crops Research**, v.102, p.22-32, 2007.
- KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. The Regulatory Region Controlling the Nitrate-Responsive Expression of a Nitrate Reductase Gene, NIA1, in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v.52, n.5, p.824-836, 2011.
- LILLO, C. Signalling cascades integrating light enhanced nitrate metabolism. **Biochemical Journal**, v.415, p.11-19, 2008.
- LIMA FILHO, J. M.; ASSIS, J. S.; TEIXEIRA, A. H. C.; CUNHA, G. A. P.; CASTRO NETO, M. T. Ecofisiologia, in: GENUÍ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 243-257.
- LÓPEZ, M.G.C.; GARCÍA, S.S.; DURÁN, I.J.L.G.; TORRES, R.M.; VALDIVIA, J.G. Evolución nutrimental foliar em três cultivares de mango em Nayarit, Mexico. **Revista Mexicana de Ciências Agrárias**, v.3, n.4, p.685-700, 2012.
- MARSCHNER, H.; MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. London: Academic Press, 2012.
- MARTUSCELLO, J.A.; MAJEROWICZ, N.; CUNHA, D.N.F.V. da; AMORIM, P. L. de; BRAZ, T.G.S. Características produtivas e fisiológicas de capim-elefante submetido à adubação nitrogenada. **Archivos de zootecnia**, v.65, n.252, p.565-570, 2016.
- MEDEIROS, A.A.; AMORIM, J.R.A.; SILVA, D.J.; DANTAS, J.A.; GUERRA, A.G. Mineral composition of leaves and fruits of irrigated mango trees in Rio Grande do Norte State, Brazil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.645, p.403-410, 2004.

MILLER, A.J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S.J.; WELLS, D.M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MOUCO, M.A. do C. **Manejo da floração de mangueiras no semi-árido do nordeste brasileiro com inibidores da síntese de giberelinas**. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia, Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu. 107 p.

MOUCO, M.D.C. **Cultivo da mangueira**. Embrapa Semiárido-Sistema de Produção (INFOTECA-E), 2015.

OLIVEIRA, G.P.; SIQUEIRA, D.L. de; SALOMÃO, L.C.C.; CECON, P.R.; MACHADO, D.L.M. Paclobutrazol and branch tip pruning on the flowering induction and quality of mango tree fruits. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.47, n.1, p.7-14, 2017.

QUEIROGA, R.C.F.; PUIATTI, M.; FONTES, P.C.R.; CECON, P.R.; FINGER, F.L. Influência de doses de nitrogênio na produtividade e qualidade do melão *Cantalupensis* sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 550-556, 2007.

QUEIROZ, C.G.S.; RENA, A.B.; CORDEIRO, A.T.; ALVES, J.D. Ritmo diurno na atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de *Coffea arábica* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.7, p.787-795, 1993.

RAJSZ, A.; WOJTUN, B.; MROZ, L.; ZOLNIERZ, L.; KEMPERS, A.J. Nitrate reductase activity in high mountain plants: a test across species, growth form and habitat type. **Press on behalf of the Institute of Botany**, 2018.

RAMÍREZ, F.; DAVENPORT, T.L. Mango (*Mangifera indica* L.) flowering physiology. **Scientia Horticulturae**, v.126, p.65-72, 2010.

RAMÍREZ, F.; DAVENPORT, T.L.; FISCHER, G. The number of leaves required for floral induction and translocation of the florigenic promoter in mango (*Mangifera indica* L.) in a tropical climate. **Scientia Horticulturae**, v.123, p.443-453, 2010.

SANDIP, M.; MAKWANA, A.N.; BARAD, A.V.; NAWADE, B.D. Physiology of Flowering- The Case of Mango. **International Journal of Applied Research**, v.1, n.11, P.1008-1012, 2015.

SANTOS, A. de S. **Indução termoperiódica da niteato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (*Ananas comosus*)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, P.P.A. **Assimilação do nitrogênio na bromélia *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal na presença de nitrato e/ou**

amônio em plantas provenientes de sementes ou de segmentos nodais. 2016. Dissertação (Mestrado em biodiversidade vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual review of plant biology**, v. 41, n. 1, p. 225-253, 1990.

SOUZA, M.A. de; MÉSQUITA, A.C.; SIMÕES, W.L.; FERREIRA, K.M.; ARAUJO, E.F.J. Physiological and biochemical characterization of mango tree with paclobutrazol application via irrigation. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 4, p. 442-449, 2016.

SUDHA, R.; BALAMOCHAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K. Effect of foliar spray of nitrogenous chemicals on flowering, fruit set and yield in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Alphonso. **Journal of Horticultural Science**, v.7, n.2, p.190-193, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TANAN, T.T. **Absorção, assimilação e transporte de nitrogênio em plantas de *Physalis angulata* L.** 2019. Tese (doutorado em recursos genéticos vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

UPRETI, K.K.; REDDY, Y.T.N.; PRASAD, S.R.S.; BINDU, G.V.; JAYARAM, H.L.; RAJAN, S. Hormonal changes in response to paclobutrazol induced early flowering in mango cv. Totapuri. **Scientia Horticulturae**, v.150, p.414-418, 2013.

URBAN, L.; LU, P.; THIBAUD, R. Inhibitory effect of flowering and early fruit growth on leaf photosynthesis in mango. **Tree Physiology**, v.24, p.387-399, 2004.

VIANA, E.M. **Interação de nitrogênio e potássio na nutrição, no teor de clorofila e na atividade da redutase de nitrato em plantas de trigo.** 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia: solos e nutrição de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

VIANA, E.M.; KIEHL, J. de C. Doses de nitrogênio e potássio no crescimento do trigo. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 975-982, 2010.

ZUAZO, V.H.D.; RUIZ, J.A.; RAYA, A.M. Fruit yield, plant growth and nutriente status in mango. **International Journal of Fruit Science**, v.5, n.4, p.3-21, 2008.

CAPÍTULO 2

VERIFICAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA ANÁLISE DA REDUTASE DO NITRATO EM MANGUEIRA (*Mangifera indica* L.)¹

RESUMO

A redutase do nitrato é a enzima chave na redução do nitrato (NO_3^-) em plantas, pois catalisa a primeira reação desse processo e é considerada limitante para a produção dos vegetais. Sua atividade pode ser quantificada pelo método *in vivo*, por meio da concentração de nitrito difundido do interior da célula vegetal para o meio de incubação. O método pode diferir entre espécies, por esse motivo requer adaptações para cada cultura. O objetivo do trabalho foi verificar as melhores condições para a quantificação da atividade da redutase do nitrato (aRN) em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer, estudando os fatores: tempo de incubação, concentração de n-propanol, concentração de nitrato e pH no meio de incubação. A coleta do material vegetal foi realizada em plantas dispostas aleatoriamente, em pomar comercial de mangueira com aproximadamente cinco anos de idade, em Petrolina-PE. Foram realizados 16 ensaios, em triplicata, sob as condições do planejamento fatorial 2^4 , com dois níveis (+1 e -1) para cada fator. Os fatores avaliados não atuam de forma independente. A condição que favorece a obtenção da maior atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens é pH 8,5, n-propanol 1% e 50 mM de nitrato de potássio (KNO_3). O melhor tempo de incubação em folhas é 60 minutos e em raízes 45 minutos.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Redução do nitrato. Meio de incubação.

ABSTRACT

Nitrate reductase is a key enzyme for nitrate reduction (NO_3^-) in plants, as it catalyzes the first reaction of this process and it may be considered limiting for the production of the plants. Its activity can be quantified by the *in vivo* method, through of the nitrite concentration diffused from the interior of the plant cell to the incubation medium. The method may differ among species; therefore, it requires adaptations for each crop. This work aimed to verify the best conditions for the quantification of nitrate reductase activity (NRa) in first and second flow leaf and young roots of mango trees (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer, studying the factors: incubation time, n-propanol concentration, nitrate concentration, and pH in the incubation medium. The vegetal sample was collected in randomly arranged mango trees five years old, grown in a commercial orchard with approximately, in Petrolina-PE. Sixteen trials were carried out, in triplicate, under the conditions of factorial planning 2^4 , with two levels (+1 and -1) for each factor. The factors evaluated do not act independently. The condition that promotes the highest nitrate reductase activity in first and second flow leaf and

¹ Artigo a ser submetido para publicação

roots is pH 8,5, n-propanol 1% and 50 mM of potassium nitrate (KNO_3). The best incubation time for leaf is 60 minutes and for roots is 45 minutes.

Keywords: Enzymatic activity. Reduction of nitrate. Incubation medium.

INTRODUÇÃO

A mangueira é cultivada em diferentes ambientes, no entanto, para a obtenção de elevada produtividade e qualidade dos frutos é necessária a interação entre os diversos fatores de produção, em especial o fornecimento de nutrientes de acordo com a sua exigência nutricional. O nitrogênio (N) é um dos macronutrientes mais importantes para a cultura, pois é constituinte da clorofila, proteínas, hormônios de crescimento e enzimas, sendo assim o fornecedor de componentes essenciais para produção de ramos, folhas e frutos (RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010). A demanda é maior na fase vegetativa da planta e influencia na relação entre o crescimento vegetativo, emissão de gemas florais e frutificação. Sua deficiência pode afetar negativamente a produção (COSTA et al., 2008).

A eficiência da planta na utilização do N leva em consideração os aspectos de absorção e metabolização desse elemento. Uma vez que o nitrogênio foi absorvido, pode ser assimilado na raiz ou ser transportado para as folhas e ser assimilado na parte aérea (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Após a sua entrada na célula, o nitrato (NO_3^-) pode ser reduzido a nitrito (NO_2^-) no citosol ou armazenado no vacúolo da célula para posterior redução e assimilação (CRAWFORD, 1995).

O processo de redução de NO_3^- é de importância biológica fundamental e é catalisado pela enzima redutase do nitrato (RN). A reação inicial é a etapa mais limitante para o crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas em plantas que assimilam esse elemento (CRAWFORD, 1995), por isso a RN foi considerada enzima chave na regulação do metabolismo de N. Esse seu papel regulador permite que a enzima seja relacionada, indiretamente, com a produtividade das culturas, baseado na suposição de que plantas com maior atividade da redutase do nitrato (aRN) tem maior capacidade de redução do nitrato disponível e uma maior capacidade de responder à adubação nitrogenada (BEEVERS; HAGEMAN, 1969).

A quantificação da aRN pode ser feita por ensaios *in vitro* e *in vivo*. As técnicas *in vitro* empregam a extração da enzima por moagem do tecido vegetal em meios de incubação adequado e medem a aRN em um meio de reação (HARPER; COOPER, 1970). Na técnica *in vivo* é feita a incubação do tecido vegetal original num meio de mistura reacional (HARPER; HAGEMAN, 1972; HARPER; NICHOLAS; HAGEMAN, 1973; JAWORSKI, 1971). Sugere-se que seja feita a adequação do método de análise da atividade da enzima para cada espécie, devido às diferentes respostas que têm sido mostradas na literatura, a fim de se obter um protocolo confiável e reproduzível (OLIVEIRA et al., 2005).

A adequação do método *in vivo* tem sido realizada variando os fatores que podem influenciar na quantificação da aRN, como por exemplo o tempo de incubação, a concentração de n-propanol, a concentração de nitrato e o pH do tampão (MEGURO; MAGALHÃES, 1982; CARELLI, 1987; OLIVEIRA et al., 2005; SANTOS, 2013; DOVIS et al., 2014). Os autores tem utilizado o método univariado de análise de dados. Tal método é normalmente empregado com o objetivo de identificar a diferença entre os tratamentos, considerando individualmente cada fator estudado e desconsiderando o efeito simultâneo entre esses fatores (MIGUEL et al., 2011). Os dados podem ser analisados pelo método de análise multivariado, onde mais de um fator pode ser estudado simultaneamente, bem como a interação entre os fatores, com o objetivo de conhecer o efeito conjunto numa determinada resposta (GIESBRECHT; GUMPERTZ, 2004; PAES, 2010; MONTGOMERY, 2013). No entanto, não foi verificado o uso desse método na quantificação da aRN.

Na análise multivariada pode ser utilizado o planejamento fatorial. No planejamento fatorial 2^k , o nível de cada fator é reduzido para dois, máximo (+1) e mínimo (-1). A construção dos planos é relativamente simples e a interpretação dos resultados dos experimentos tende a ser clara (GIESBRECHT; GUMPERTZ, 2004). Esse planejamento fornece o menor número de experimentos com os quais os fatores k podem ser estudados em um planejamento fatorial completo. Por esse motivo, são projetos muito utilizados em experimentos de triagem de fator (MONTGOMERY, 2013).

Desse modo, o trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar as melhores condições para a quantificação da atividade da redutase do nitrato

(aRN) em folhas de 1^o e 2^o fluxo vegetativo e em raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer, estudando os fatores: tempo de incubação, concentração de n-propanol, concentração de nitrato e pH no meio de incubação.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises laboratoriais foram realizadas nos laboratórios de Química Analítica e de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), *Campus* Ciências Agrárias (CCA), situada no município de Petrolina- PE, em maio de 2019.

A coleta do material vegetal foi realizada em pomar comercial de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer, na fase de frutificação, com aproximadamente cinco anos de idade, plantas espaçadas em 7 x 2 m e área total de 4,7 ha, na fazenda Frutavi, localizada no Perímetro Irrigado Nilo Coelho, Petrolina- PE (9°18'19.2" S de latitude, 40°33'55.9" O de longitude, a uma atitude 365,5 m acima do nível do mar).

Foi aplicado o planejamento fatorial completo 2⁴, com 4 fatores em 2 níveis (+1 e -1) (Tabela 1). Os níveis foram escolhidos baseados em experimentos encontrados na literatura (OLIVEIRA et al., 2005; SANTOS, 2013; DOVIS et al., 2014). Foi gerada uma matriz com o total de 16 ensaios realizados em triplicata (Tabela 2). Os parâmetros experimentais selecionados para o planejamento fatorial 2⁴ foram: tempo de incubação (min) e os componentes do meio de incubação (tampão fostafo), concentração de N-propanol (%), concentração de nitrato de potássio (mM) e pH.

Tabela 1. Níveis mínimos (-1) e máximos (+1) dos fatores estudados na quantificação da atividade da redutase do nitrato (aRN) em folhas de 1^o e 2^o fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer.

Fatores	Níveis	
	-1	+1
Tempo de incubação (min)	15	75
N-propanol (%)	1	5
Nitrato (mM)	0	200
pH	6,67	8,5

Tabela 2. Matriz com Planejamento Fatorial completo 2^4 , com 2 níveis e 4 fatores, para a quantificação da atividade da redutase do nitrato (aRN) em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer.

Experimento	Tempo de incubação (min)	N-propanol (%)	Nitrato (mM)	pH
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1

A coleta do material vegetal para a triagem dos fatores foi realizada em plantas amostradas ao acaso dentro do mangueiral entre 9 horas e 10 horas. Foram coletadas 72 folhas de 1º fluxo e 72 folhas de 2º fluxo vegetativo, todas expostas à radiação solar, armazenadas em sacos plásticos e acondicionadas em caixa térmica contendo gelo. As raízes jovens foram coletadas na porção do solo onde se concentrava a irrigação, na profundidade de até 10 cm, armazenada em papel alumínio, colocada juntamente com as folhas na caixa térmica e levadas para o laboratório.

A atividade da redutase do nitrato (aRN) *in vivo* foi determinada de acordo com o método descrito por Majerowicz et al. (2003) com algumas alterações. As folhas passaram por uma sequência de lavagem com água corrente, detergente 1%, água corrente e água destilada, nessa ordem. Enquanto as raízes foram lavadas em peneira somente com água corrente e água destilada para evitar a perda do material vegetal.

Após uma secagem superficial, foram retirados discos de 7 mm do limbo foliar formando uma amostra composta para os dois tipos de folha. Cada amostra simples analisada conteve 60 discos e foi pesada para obtenção da massa. As raízes foram picadas em fragmentos pequenos formando uma

amostra composta. Cada amostra simples conteve 0,5 g de raiz. As porções de folhas e raízes foram depositadas em tubos falcon coberto com papel alumínio, aos quais foram adicionados 4 mL da solução tampão fosfato, preparado de acordo com a matriz contida na Tabela 2. Em seguida, o tecido vegetal submerso na solução foi submetido a três sessões de vácuo, cada uma de 1 minuto (min) com intervalos de 30 segundos (s). Os tubos foram devidamente fechados e incubados no intervalo de tempo definido de acordo com a matriz contida na Tabela 2, à temperatura de 30 °C.

Após o período de incubação, os tubos foram submetidos à imersão em gelo por dois minutos. A quantidade de nitrito (NO_2^-) liberada no meio de incubação foi determinada em alíquotas de 2 mL com a adição de 1 mL de N-naftil-etileno-diamino a 0,2% (m/v) e 1 mL de Sulfanilamida a 1% (m/v), que reagiu por trinta min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS marca EVEN a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em μmol de nitrito liberado por 1 g de folha fresca por hora de incubação ($\mu\text{mol} \cdot \text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), calculada com base em equação linear obtida através da curva padrão de nitrito, previamente preparada (Figura 1).

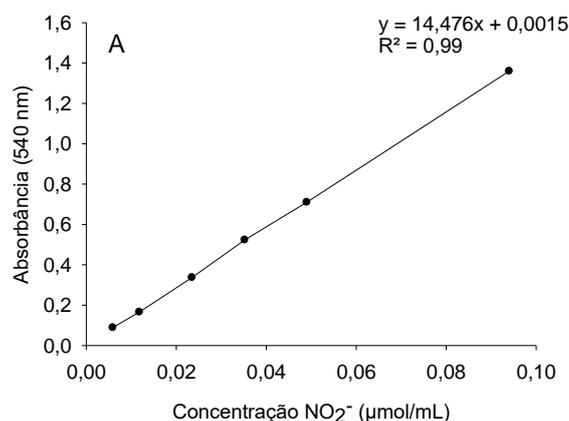


Figura 1. Curva de calibração para estimar a atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens em mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer.

Para tratamento dos dados foi utilizado o software estatístico Statistica Experimental design versão 8.0.

Foi realizado um segundo experimento com o objetivo de definir o melhor tempo de incubação para os três tipos de material vegetal avaliado. Para esse, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado

com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$ utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos gráficos de Pareto é possível observar o efeito dos fatores e das interações entre eles para folhas de 1º (Figura 2) e 2º fluxo vegetativo (Figura 3) e raízes jovens (Figura 4). Todos os efeitos e interações que ultrapassaram a linha tracejada foram significativos, enquanto aqueles que não ultrapassaram foram não significativos, não influenciando na atividade da redutase do nitrato (aRN) ao nível de significância de 95%. Os valores dos efeitos estimados de cada fator e das interações aparecem à direita de cada barra.

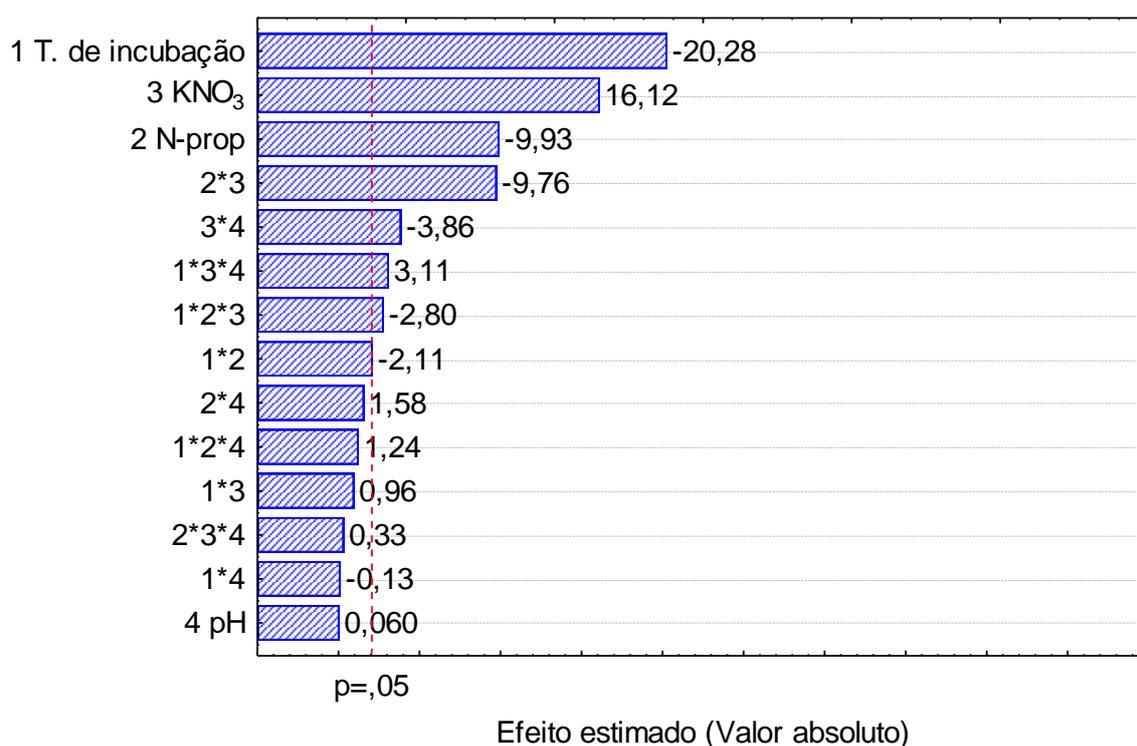


Figura 2. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2^4 obtido para a atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em folhas de 2º fluxo vegetativo de mangueira (*Mangifera indica* L.) (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança).

T. de incubação: tempo de incubação(1); N-prop: n-propanol (2); KNO₃: nitrato de potássio (3); pH (4).

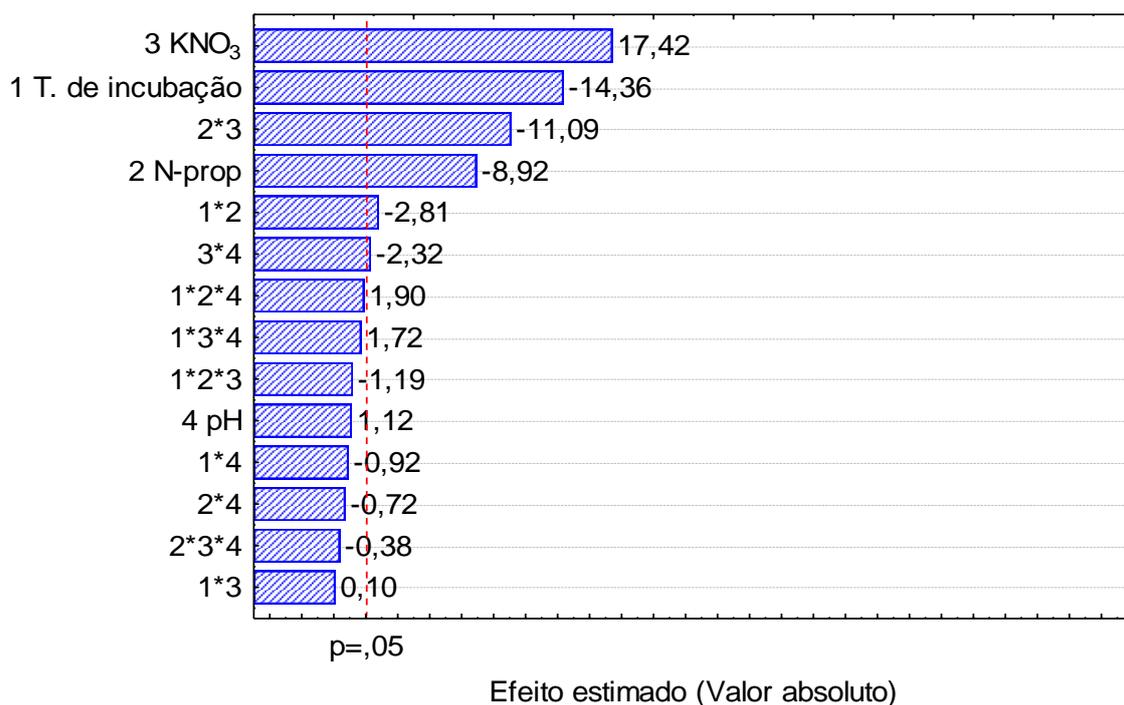


Figura 3. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2^4 obtido para a atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em folhas de 1º fluxo vegetativo de mangueira (*Mangifera indica* L.) (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança).

T. de incubação: tempo de incubação(1); N-prop: n-propanol (2); KNO₃: nitrato de potássio (3); pH (4).

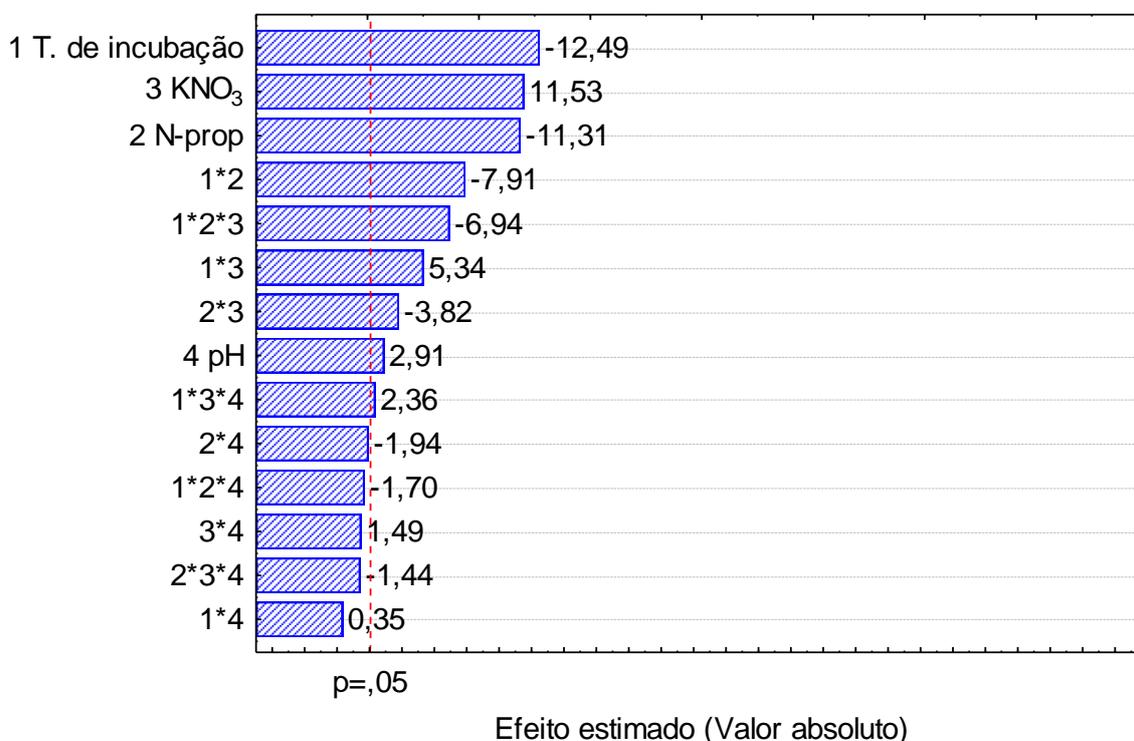


Figura 4. Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2^4 obtido para a atividade da enzima redutase do nitrato (aRN) em raízes jovens de mangueira (*Mangifera indica* L.) (a linha vertical define 95% do intervalo de confiança).

T. de incubação: tempo de incubação(1); N-prop: n-propanol (2); KNO₃: nitrato de potássio (3); pH (4).

De acordo com as figuras pode ser inferido que o tempo de incubação foi a variável com efeito mais significativo no processo de determinação da aRN para as folhas de 2º fluxo e raízes, sendo o segundo mais importante para as folhas de 1º fluxo (Figuras 2, 3 e 4). O valor negativo dos coeficientes mostra o efeito negativo da variável na quantificação da aRN nesses tecidos vegetais de mangueira, indicando que pode ser prejudicada com o aumento do tempo.

O tempo de incubação é importante por estar relacionado à completa infiltração do meio de reação nos tecidos vegetais e a necessidade de tempo para a homogeneização da temperatura (OLIVEIRA et al., 2005). Na quantificação da aRN, o tempo ideal depende da espécie ou tecido em estudo (CAZETTA; VILLELA, 2004). DAVIS et al. (2014) observaram, em laranjeiras (*Citrus sinensis* L.), maior atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes com o aumento do tempo de incubação. Em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*), a aRN aumentou acentuadamente a partir de 30 min de incubação, sendo adotado 60 min como o melhor tempo para essa quantificação (OLIVEIRA et al., 2005). Já em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), a atividade ótima da enzima foi encontrada no tempo de 20 min de incubação (KOUADIO et al., 2007). Segundo esses autores, como a redução do nitrato é uma reação espontânea e reversível, podendo ser inibida pelos produtos da reação, um tempo de incubação mais longo poderia reduzir a atividade da enzima.

A concentração de nitrato de potássio (KNO_3) foi o segundo fator mais significativo para folhas de 2º fluxo e raízes, sendo o primeiro na ordem de significância para as folhas de 1º fluxo (Figuras 2, 3 e 4). Para todos os tecidos, a presença de KNO_3 apresentou-se com efeito positivo, favorecendo a aRN na maior concentração de NO_3^- . Segundo Martuscello et al. (2016), a atividade da enzima é induzida pelo seu substrato.

DAVIS et al. (2014) verificaram a aRN em folhas de laranjeiras (*Citrus sinensis* L.) mesmo na ausência do substrato exógeno e sugeriu a existência de uma reserva de nitrato nos vacúolos foliares, o que também foi observado no presente trabalho em folhas e raízes de mangueira. No entanto, o aumento na concentração de KNO_3 aumentou potencialmente a aRN em folhas e raízes, sendo que as raízes exigem uma menor concentração para apresentar sua máxima atividade. Em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) foi observada uma

baixa aRN na ausência de substrato exógeno ao meio de reação, obtendo uma maior resposta quando 100 mM de KNO_3 foi adicionado (KOUADIO et al., 2007). Em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), Santos et al. (2014) confirmaram a dependência do acréscimo da solução de NO_3^- no meio de incubação ao observarem praticamente nenhuma aRN na ausência de KNO_3 , indicando que os tecidos foliares dessa cultura não acumularam NO_3^- suficiente para produzir nitrito detectável no meio de incubação. De acordo com Ishikawa et al. (2009), quando não há o acúmulo de nitrato nas folhas, pode indicar que esse foi prontamente metabolizado ao chegar nessas células. É necessária a adição de nitrato no meio de reação quando se pretende verificar a máxima aRN, lembrando que concentrações muito baixas e muito altas podem interferir na estimativa (SANTOS et al., 2014).

O n-propanol foi o fator com terceiro maior efeito significativo para folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens (Figuras 2, 3 e 4). Essa variável também teve efeito negativo na quantificação da aRN para todos os materiais vegetais. Desse modo, o aumento na concentração de n-propanol reduziu a atividade da redutase do nitrato. Esse composto químico é um solvente orgânico e pode causar a desorganização da configuração de proteínas (JAMUR; OLIVER, 2010), grupo em que se enquadra a redutase do nitrato (SANTOS et al., 2014), o que pode justificar essa redução na atividade da enzima.

Para quantificar a aRN é necessário que o NO_3^- do meio de reação entre nas células e o nitrito (NO_2^-) produzido difunda-se para o meio de reação para ser detectado (SANTOS et al., 2014). O n-propanol facilita a transferência do nitrato do meio de incubação, ou do vacúolo, para o citoplasma, ficando mais acessível à redução pela redutase do nitrato (LILLO, 1983; NIEVOLA; MERCIER, 2001), pois esse solvente aumenta a permeabilidade celular ao NO_3^- e ao NO_2^- , facilitando também a liberação do nitrito produzido na célula no meio de incubação (JAWORSKI, 1971). A taxa de difusão do NO_2^- formado para a solução de incubação é utilizada como indicadora da atividade da redutase do nitrato (JAWORSKI, 1971).

Santos et al. (2014) também concluíram que o aumento da concentração de n-propanol tem efeito negativo na quantificação da aRN em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), pois, à medida que se aumentou a

concentração no meio de incubação, a aRN diminuiu. O aumento na concentração desse solvente reduziu a aRN em folhas de laranjeiras (*Citrus sinensis* L.), sendo 1% a concentração ótima para a máxima atividade da enzima. Em raízes não foi observada diferença significativa com as diferentes concentrações (DOVIS et al., 2014). Já em folhas e raízes de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), o aumento na concentração de n-propanol (4% e 3%, respectivamente) favoreceu a aRN (NIEVOLA; MERCIER, 2001).

O pH foi significativo apenas para as raízes, embora tenha apresentado uma significância baixa e bem inferior às demais variáveis (Figura 4). Como o efeito foi positivo, o pH do meio de incubação mais elevado favoreceu a quantificação da aRN. Para folhas de 1º e 2º fluxo esse efeito não foi significativo (Figura 2 e 3), indicando que é possível obter a aRN nas folhas em uma ampla faixa de pH, entre 6,67 e 8,5.

O efeito do pH no meio de incubação está relacionado a alterações na estrutura molecular da enzima ou a mudanças na velocidade de translocação de NO_3^- e NO_2^- por meio da membrana (OLIVEIRA et al., 2005). A faixa adequada de pH para a quantificação da aRN pode variar em diferentes espécies como *Gossypium hirsutum* (KOUADIO et al., 2007), *Saccharum officinarum* (SANTOS et al., 2014), *Saccharum spp.* (SANTOS, 2013) e *Bactris gasipaes* (OLIVEIRA et al., 2005).

Nos gráficos de Pareto pode-se observar a presença de interações entre os fatores (Figuras 2, 3 e 4). Para indicar o efeito dos fatores dentro das interações duplas e triplas foi utilizado o gráfico dos efeitos. As condições melhores são indicadas pelas retas e a inclinação indica o nível de significância, de modo que o ponto mais alto indica a melhor condição. Quanto maior a inclinação, maior a alteração na resposta causada por aquele efeito (GIROTTO et al., 2007).

A interação tripla entre os fatores foi significativa apenas para folhas de 2º fluxo e raízes. Na interação negativa entre o tempo de incubação, n-propanol e KNO_3 , observa-se que na ausência de KNO_3 o efeito do n-propanol é baixo para ambos os tecidos e o menor tempo de incubação favorece a atividade da enzima. Quando na presença de KNO_3 , a menor concentração de n-propanol favorece a atividade da redutase do nitrato num tempo de

incubação menor e maior para folhas de 2º fluxo e raízes, respectivamente (Figura 5 A e 5 B).

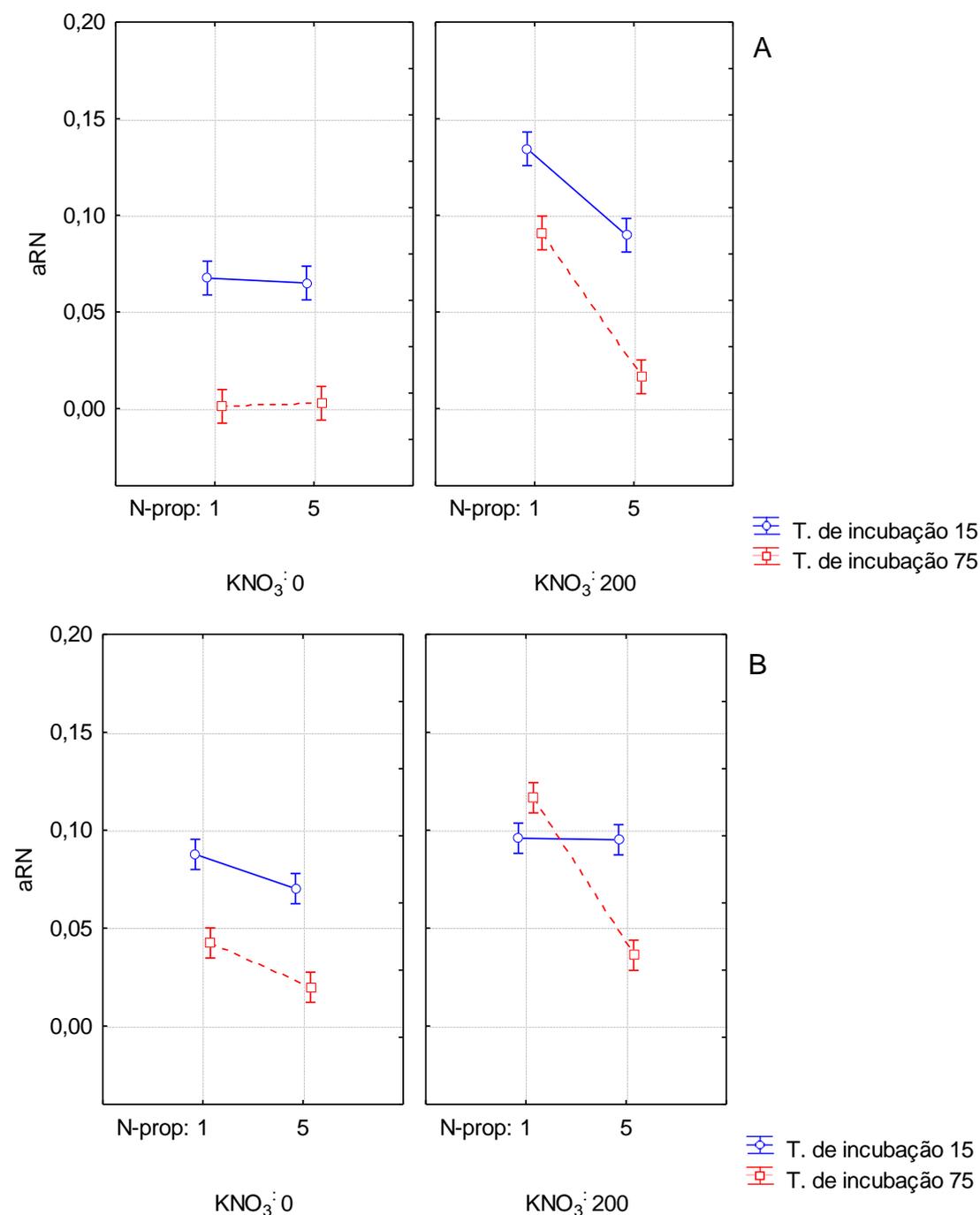


Figura 5. Gráfico de efeitos do planejamento fatorial completo 2⁴ da interação entre os fatores tempo de incubação, n-propanol e KNO₃ para folhas de 2º fluxo (A) e raízes (B) de mangueira (*Mangifera indica* L.).

T. de incubação: tempo de incubação; 15: 15 minutos; 75: 75 minutos; N-prop: n-propanol; 1: 1%; 5: 5%. aRN: atividade da redutase do nitrato; KNO₃: nitrato de potássio; 0: 0 mM; 200: 200 mM.

Na interação entre o tempo de incubação, KNO₃ e pH, a maior concentração de KNO₃ e menor tempo de incubação favorecem a atividade da

enzima que é pouco influenciada pelo pH, tanto em folhas de 2º fluxo como em raízes (figura 6 A e 6 B).

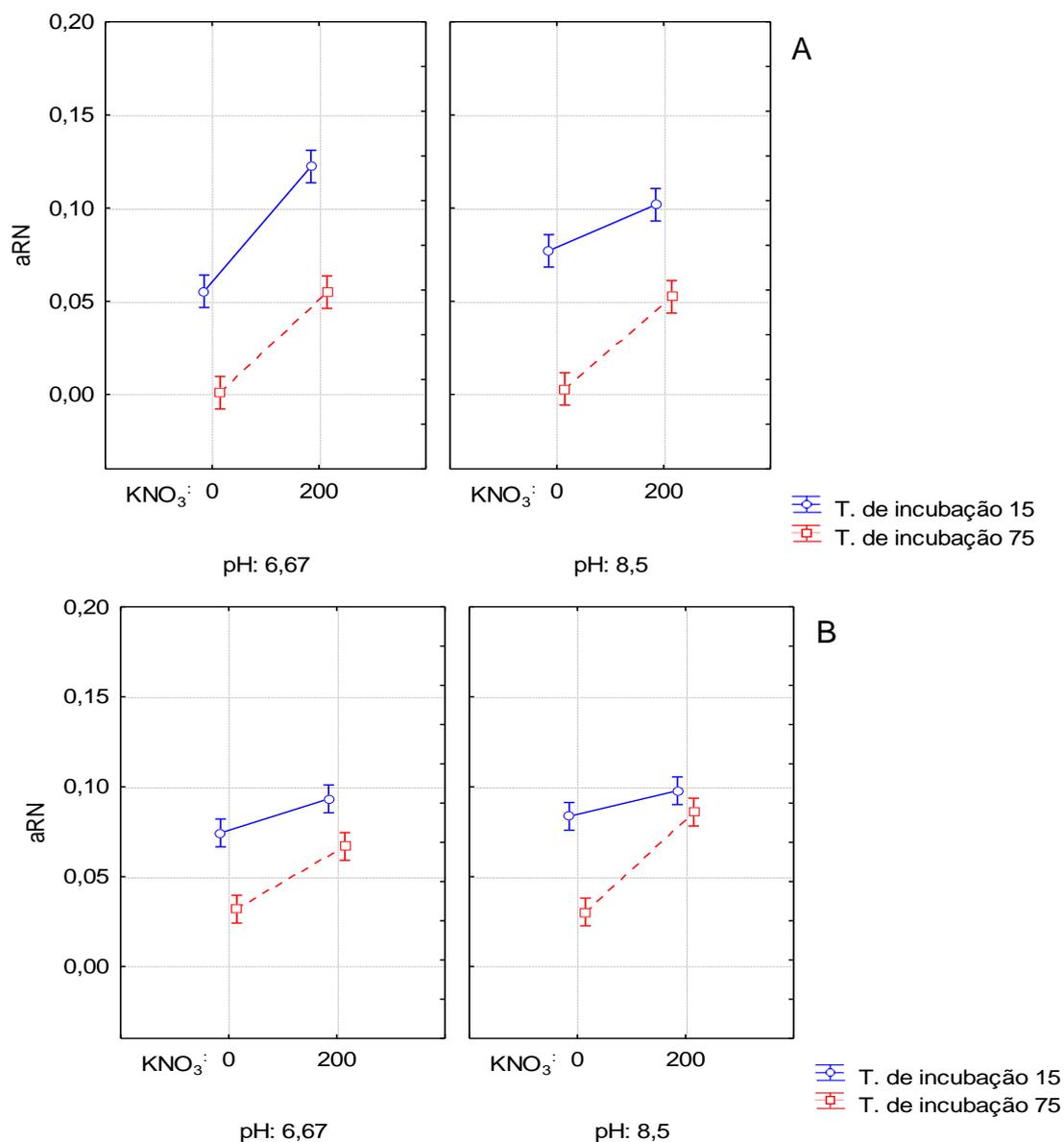


Figura 6. Gráfico de efeitos do planejamento fatorial completo 2^4 da interação entre os fatores tempo de incubação, KNO₃ e pH para folhas de 2º fluxo (A) e raízes (B) de mangueira (*Mangifera indica* L.).

T. de incubação: tempo de incubação; 15: 15 minutos; 75: 75 minutos; aRN: atividade da redutase do nitrato; KNO₃: nitrato de potássio; 0: 0 mM; 200: 200 mM.

Considerando que não houve interação tripla significativa para folhas de 1º fluxo, o efeito dos fatores foi demonstrado por meio das interações duplas significativas. Na interação entre KNO₃ e n-propanol, a aRN é favorecida com a maior concentração do sal e menor concentração do solvente orgânico (Figura 7 A). Na interação entre tempo de incubação e n-propanol, o efeito dos fatores

é pouco significativo, porém a atividade da enzima é favorecida em menor concentração de n-propanol e um menor tempo de incubação (Figura 7 B). Observar-se que a interação entre KNO_3 e pH tem efeito pouco significativo, no entanto a maior concentração de KNO_3 favorece a aRN (Figura 7 C).

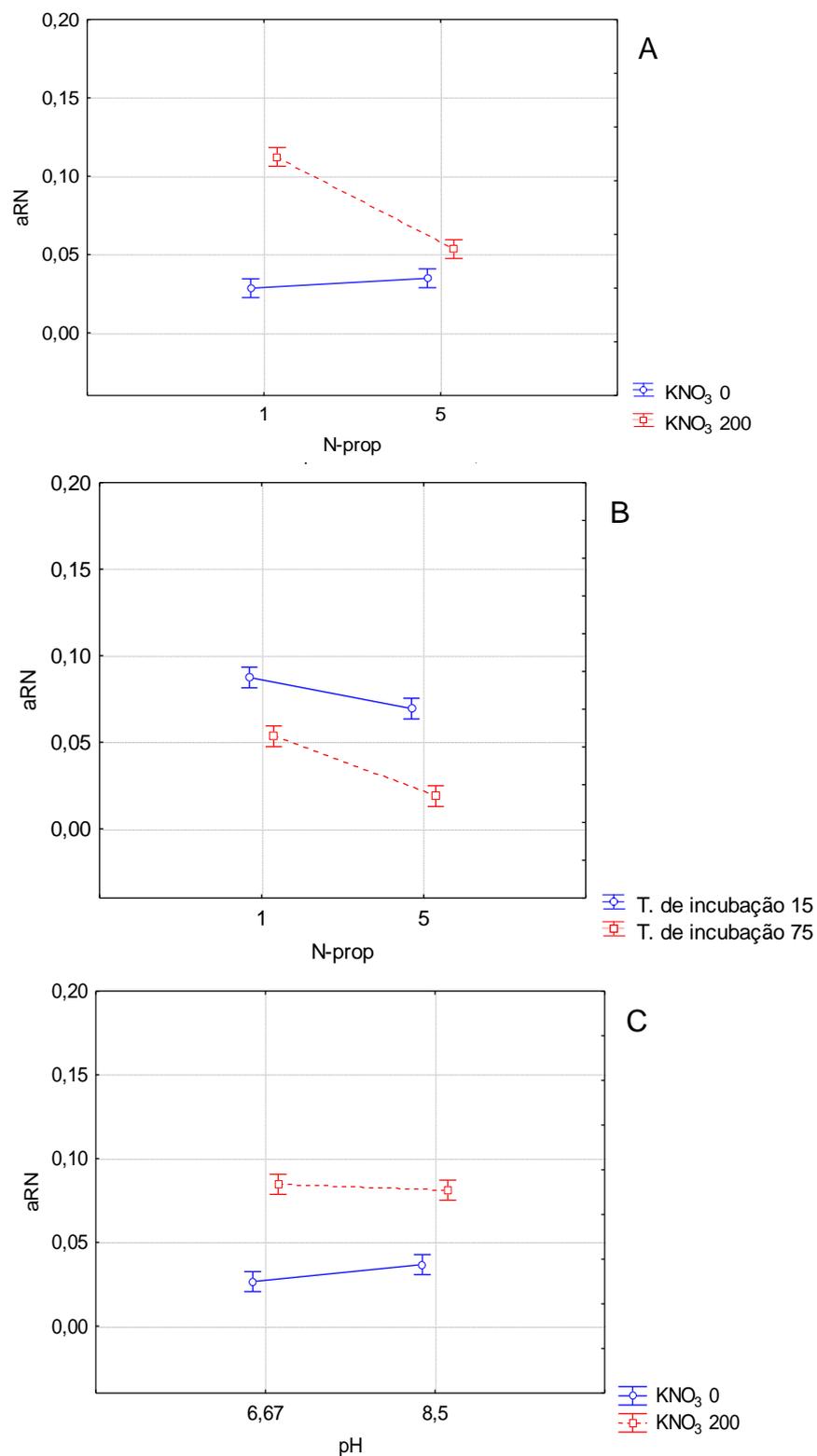


Figura 7. Gráfico de efeitos das interações duplas do planejamento fatorial completo 2^4 entre os fatores KNO₃ e N-prop (A), tempo de incubação e N-prop (B); KNO₃ e pH (C) para folhas de 1^o fluxo de mangueira (*Mangifera indica* L.).

T. de incubação: tempo de incubação; 15: 15 minutos; 75: 75 minutos; aRN: atividade da redutase do nitrato; KNO₃: nitrato de potássio; 0: 0 mM; 200: 200 mM; N-prop: N-propanol; 1: 1%; 5: 5%.

As interações duplas significativas, para folhas de 1º fluxo, estão representadas em gráficos de quadrado e as triplas significativas, para folhas de 2º fluxo e raízes, em gráficos de cubo, onde cada vértice representa uma combinação entre os fatores, indicando a condição favorável para a quantificação da maior atividade da redutase do nitrato (aRN).

A interação dupla com efeito mais significativo em folhas de 1º fluxo foi entre KNO_3 e n-propanol (Figura 3). A partir do quadrado percebe-se que a maior aRN foi encontrada na maior concentração de KNO_3 (200 Mm) e menor concentração de n-propanol (1%) (Figura 8 A).

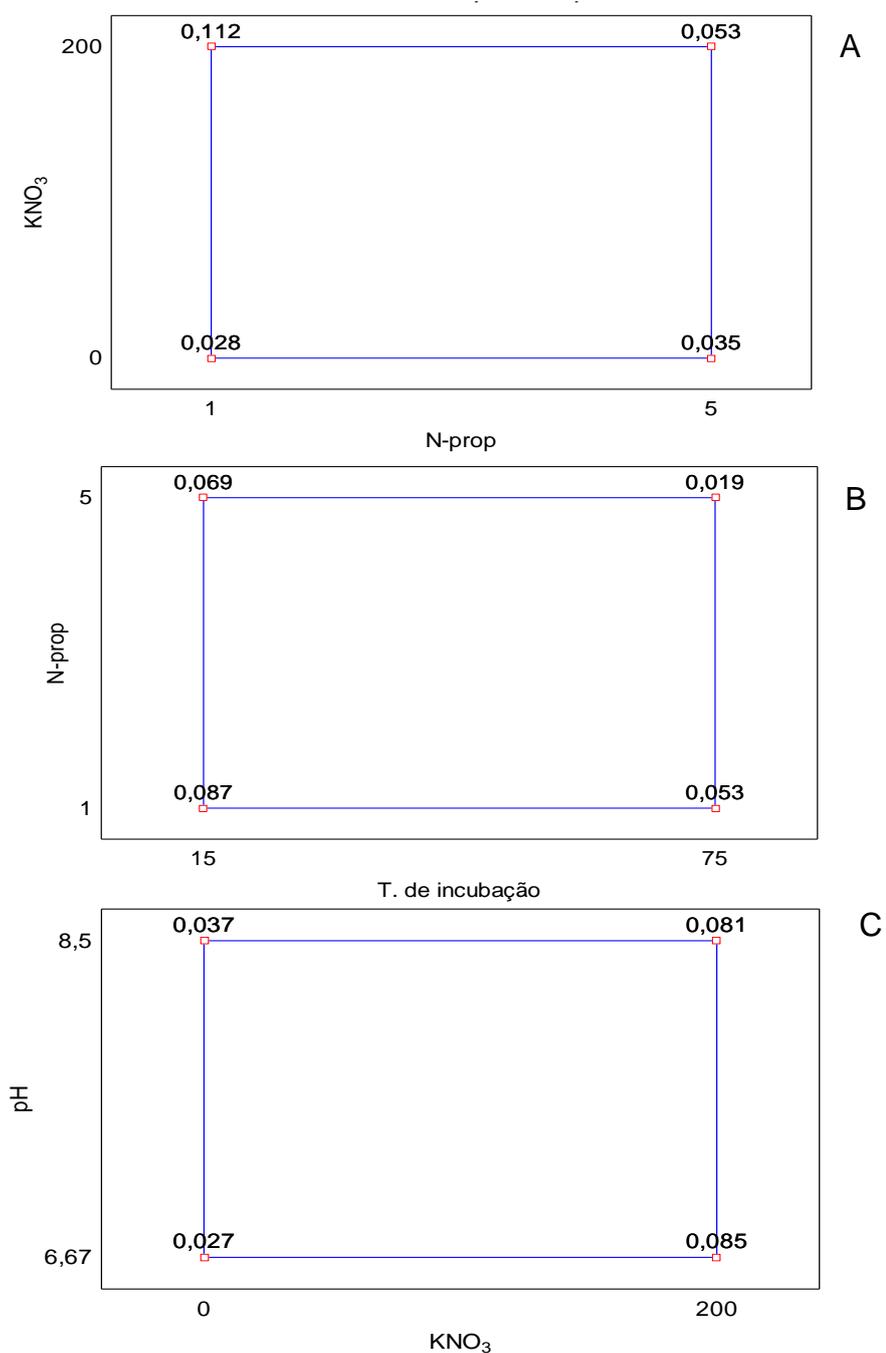


Figura 8. Gráfico de quadrado das interações duplas do planejamento fatorial completo 2^4 entre os fatores KNO₃ e N-prop (A), tempo de incubação e N-prop (B); KNO₃ e pH (C) para folhas de 1º fluxo de mangueira (*Mangifera indica* L.).

T. de incubação: tempo de incubação; 15: 15 minutos; 75: 75 minutos; KNO₃: nitrato de potássio; 0: 0 mM; 200: 200 mM; N-prop: N-propanol; 1: 1%; 5: 5%.

A segunda interação dupla mais significativa foi entre tempo de incubação e n-propanol (Figura 3), com a maior aRN quantificada quando ambos os fatores se encontraram nas condições mínimas (Figura 8 B).

A terceira e última interação dupla significativa para folhas de 1º fluxo foi entre KNO_3 e pH (Figura 3), com a maior atividade da enzima na maior concentração de KNO_3 e menor pH, embora seja um valor muito próximo ao encontrado no maior pH, demonstrando mais uma vez a pequena significância do pH na quantificação da aRN (Figura 8 C).

A interação tripla com efeito mais significativo para folhas de 2º fluxo foi entre os fatores tempo de incubação, KNO_3 e pH, sendo essa a segunda mais significativa para as raízes (Figuras 2 e 4). Através do cubo é possível perceber que a maior aRN no tecido foliar foi encontrada quando o tempo de incubação foi o mínimo (15 min), a concentração de KNO_3 foi máxima (200 mM) e o pH mínimo (6,67), sendo diferente nas raízes apenas quanto ao pH, que favoreceu a aRN quando esteve no máximo (8,5) (Figuras 9 A e 9 B).

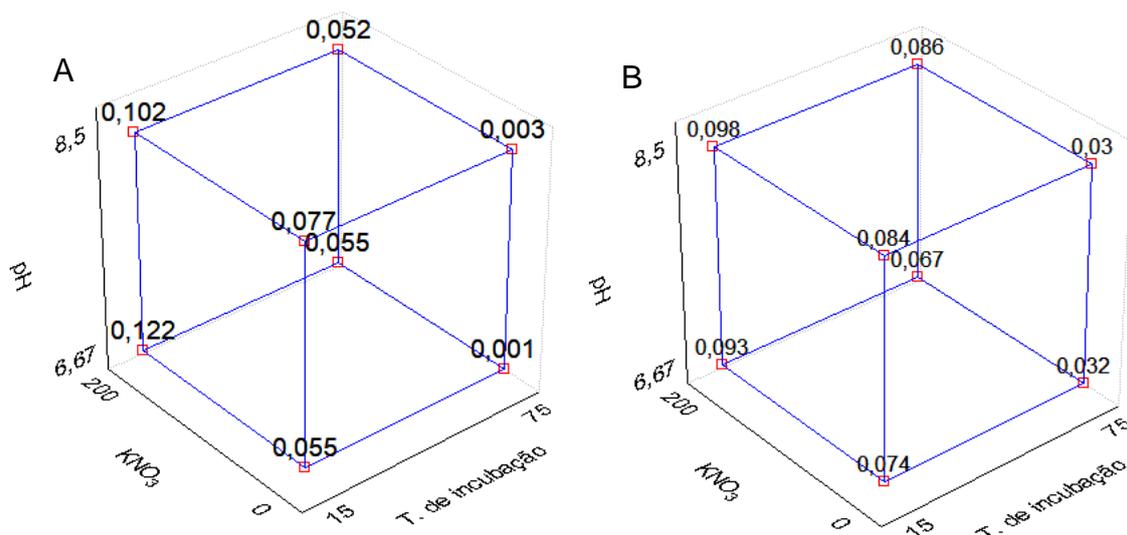


Figura 9. Gráfico de cubo do planejamento fatorial completo 2⁴ para a interação entre os fatores tempo de incubação, KNO_3 e pH em folhas de 2º fluxo (A) e raízes (B) de mangueira (*Mangifera indica* L.).

T. de incubação: tempo de incubação em minutos; KNO_3 : nitrato de potássio em mM (milimolar).

A segunda interação com efeito significativo para folhas de 2º fluxo foi entre os fatores tempo de incubação, n-propanol e KNO_3 (Figura 2), sendo essa interação a primeira mais significativa para as raízes (Figura 4). A maior aRN em folhas de 2º fluxo foi observada quando o primeiro e segundo fator esteve no mínimo (15 min e 1%, respectivamente) e o terceiro fator na concentração máxima (200 mM), se diferenciando das raízes apenas quanto ao

tempo de incubação, que o maior (75 min) favoreceu a maior atividade da enzima nesses tecidos (Figuras 10 A e 10 B).

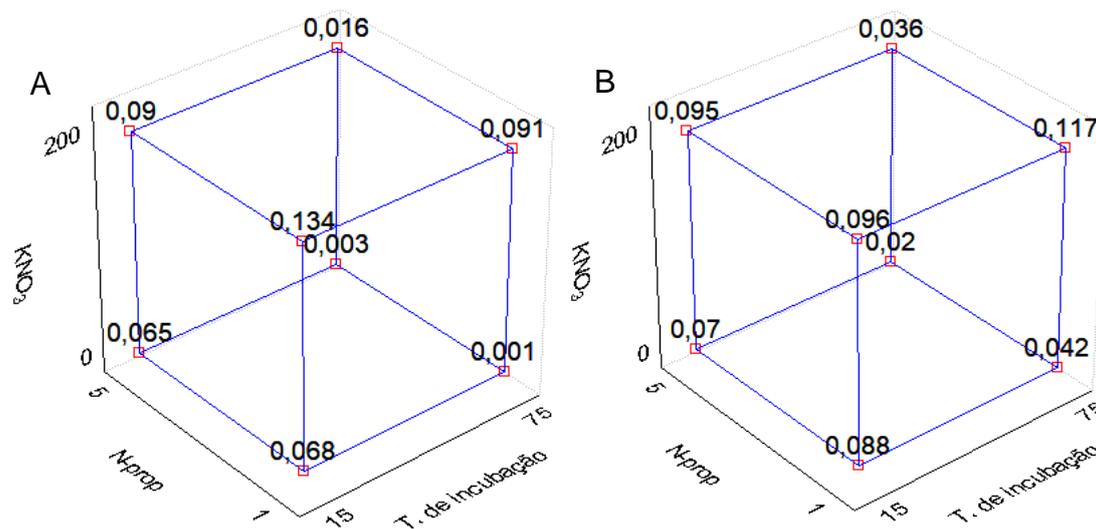


Figura 10. Gráfico de cubo do planejamento fatorial completo 2⁴ para a interação entre os fatores tempo de incubação, n-propanol e KNO₃ em folhas de 2^o fluxo (A) e raízes (B) de manga (*Mangifera indica* L.).

T. de incubação: tempo de incubação em minutos; KNO₃: nitrato de potássio em mM; N-prop: n-propanol em %.

No segundo experimento, a fim de definir o tempo de incubação ideal para quantificar a atividade da redutase do nitrato, observou-se que em folhas de 2^o fluxo, a maior atividade da enzima foi encontrada nos tempos de 60, 75 e 90 minutos de incubação, não havendo diferença estatística significativa entre eles. Em folhas de 1^o fluxo, independente do tempo, a atividade da enzima foi igual. No tecido radicular, a maior atividade da enzima foi encontrada nos tempos de 30, 45 e 90 minutos de incubação, que foram iguais estatisticamente (Tabela 3).

Tabela 3. Síntese da análise de variância para folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens (material vegetal) de mangueira cv. Palmer em diferentes tempos de incubação.

Fonte de variação	Valor 'F'		
	Folha 1º fluxo	Folha 2º fluxo*	Raiz*
Tempo de incubação	1,38	24,02*	11,22*
30	0,076	0,065 b	0,089 a
45	0,084	0,052 b	0,079 ab
60	0,091	0,106 a	0,064 bc
75	0,079	0,109 a	0,062 c
90	0,074	0,100 a	0,084 a
CV (%)	14,21	12,4	9,47

É provável que essa diferença na resposta entre os tecidos vegetais seja devido às características estruturais. Em folhas, o número de camadas que forma a epiderme pode variar de acordo com a intensidade luminosa e disponibilidade de água, por exemplo. Folhas que recebem muita radiação solar (folhas de sol), o que ocorre em condições semiáridas, são usualmente mais espessas e diferenciadas (MENEZES et al., 2006), além da cutícula cerosa que cobre a superfície foliar para evitar a perda de água nessas condições (TAIZ; ZEIGER, 2017), sendo então necessário maior tempo de incubação para quantificar a aRN nos tecidos foliares, enquanto que as células epidérmicas das raízes são unisseriadas, com uma fina cutícula junto à epiderme e são pouco resistentes à passagem de água e sais minerais (GLÓRIA; HAYASHI, 2006), sendo então um menor tempo de incubação suficiente para quantificar a aRN.

Considerando que o aumento no tempo de incubação tem efeito negativo sobre a atividade da redutase do nitrato na cultura da mangueira, o ideal é que seja definido um tempo mínimo capaz de quantificar a maior aRN em cada tecido vegetal avaliado, sendo então 60 minutos para folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e 45 minutos para raízes jovens. Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa nos diferentes tempos de incubação em folhas de 1º fluxo, somente a partir de 60 minutos é possível detectar valores de absorvância dentro da curva padrão de nitrito, realizada para estimar a atividade da enzima. De igual modo foi verificado para a raiz, porém a partir de 45 minutos de incubação.

De forma a buscar as melhores condições levando em consideração a detecção da aRN e reduzir custos e tempo analítico, utilizou-se a concentração de KNO_3 de 50mM, condição ótima determinada por Oliveira et al. (2005), Nievola et al. (2001), Santos et al. (2014) e Santos Neto et al. (2019).

CONCLUSÕES

Os fatores tempo de incubação, concentração de n-propanol, concentração de nitrato de potássio e pH não atuam independentemente, havendo interação entre eles para folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira, variando as interações.

A condição que favorece a obtenção da atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens é pH 8,5, 1% de n-propanol e 50 mM de nitrato de potássio (KNO_3).

O melhor tempo de incubação para quantificar a atividade da redutase do nitrato em folhas é 60 minutos.

O melhor tempo de incubação para quantificar a atividade da redutase do nitrato em raízes jovens é 45 minutos.

REFERÊNCIAS

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

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

CAMPOS, A.G. de. **Avaliação do estado nutricional, taxa fotossintética e produção de biomassa do sorgo sacarino submetido a combinações de dose de nitrogênio e potássio**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba. 70 p.

CARELLI, M.L.C. **Estudo do processo de redução de nitrato durante o desenvolvimento inicial e no estágio reprodutivo de plantas de café (*Coffea arabica* L.)**. 1987. Tese (Doutorado em Ciências na área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 122 p.

CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I.; MAGALHÃES, A.C. Redução de nitrato em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de luz e de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 1, p. 1-9, 1990.

- CAZETTA, J.O.; VILLELA, L.C.V. NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN LEAVES AND STEMS OF TANNER GRASS (*Brachiaria radicans* Napper). **Scientia Agricola**, v. 61, n. 6, p. 640-648, 2004.
- COSTA, A.N. da; COSTA, A. de F.S. da; CAETANO, L.C.S.; VENTURA, J.A. **Recomendações técnicas para a produção de manga**. INCAPER: Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Espírito Santo, 2008.
- CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 859-868, 1995.
- DOVIS, V.L.; HIPPLER, F.W.R.; SILVA, K.I.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; MATTOS JUNIOR, D. Optimization of the nitrate reductase activity assay for citrus trees. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 383-390, 2014.
- GIESBRECHT, F.G.; GUMPERTZ, M.L. Planning, construction and statistical analysis of comparative experiments. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. 693 p.
- GIROTTI, G.; NOGUEIRA, K.L.; MOURA, J.A.; SOUZA, J.B.; GIACOMETTI, L.L.; MARCHI, M.R.R.; TOGNOLLI, J.O. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. **Eclética Química**, v. 32, n. 2, 2007.
- GLÓRIA, B.A. da; HAYASHI, A.H. Raiz. In: GLÓRIA, B.A. da; GUERREIRO, S.M.C. (Org.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa, 2006. p. 267-273.
- HARPER, J.E.; COOPER, R.L. Nodulation response of soybeans (*Glycine max* L. Merr.) to application, rate and placement of combined nitrogen. **Crop Science**, v. 11, n. 3, p. 438-440, 1970.
- HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Plant Physiology**, v. 49, n.2, p. 146-154, 1972.
- HARPER, J.E.; NICHOLAS, J.C.; HAGEMAN, R.H. Seasonal and canopy variation in nitrate reductase activity of soybean (*Glycine max* L. Merr.) Varieties. **Crop Science**, v. 12, n. 3, p. 382-386, 1973.
- ISHIKAWA, S.; ANDO, S.; SAKAIGAICHI, T.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate-N concentration of sugarcane. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 55, n. 4, p. 485-495, 2009.
- JAMUR, M.C.; OLIVER, C. Permeabilization of cell membranes. In: Permeabilization of Cell Membranes (Ed.) **Immunocytochemical methods and protocols**, 3. ed., Totowa: Humana Press, 2010. v. 588, p. 63-66.

JAWORSKI, E.C. Nitrate reductase assay in intact plant tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, n. 6, p. 1274-1279, 1971.

KOUADIO, J.Y.; KOUAKOU, H.T.; KONE, M.; ZOUZOU, M.; ANNO, P.A. Optimum conditions for cotton nitrate reductase extraction and activity measurement. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 7, pp. 923-928, 2007.

LILLO, C. Studies of diurnal variations of nitrate reductase activity in barley leaves using various assay methods. **Physiologia Plantarum**, v. 57, p. 357-362, 1983.

MAJEROWICZ, N.; FRANÇA, M.G.C.; PERES, L.E.P.; MÉDICI, L.O.; FIGUEIREDO, S.A. *Fisiologia Vegetal - Curso Prático*, Âmbito Cultural Edições Ltda., RJ, 2003.

MARTUSCELLO, J.A.; MAJEROWICZ, N.; CUNHA, D.N.F.V. da; AMORIM, P. L. de; BRAZ, T.G.S. Características produtivas e fisiológicas de capim-elefante submetido à adubação nitrogenada. **Archivos de zootecnia**, v.65, n.252, p.565-570, 2016.

MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. Atividade da redutase do nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 12, p. 1725-1731, 1982.

MENEZES, N.L. de; SILVA, D. da C.; PINNA, G.F. de A.M. de. Folha. In: GLÓRIA, B.A. da; GUERREIRO, S.M.C. (Org.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa, 2006. p. 303-311.

MESQUITA, A.C.; MORAES, J.P.S. de; SOUZA, V. de; FERREIRA, K.M.; CAMPOS, L.D.A.; VIEIRA, D.A. Alteração bioquímica e enzimática em porta-enxertos de videira sob diferentes fontes de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 23, 2018.

MIGUEL, A.C.A.; DURIGAN, J.F.; FERRAUDO, A.S. Técnicas de análise multivariada na avaliação de injúrias pelo frio em mangas cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p. 371-376, 2011.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 8.ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2013.

NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H. Variações diurnas da atividade in vivo da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. - Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 3, p. 295-301, 2001.

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

PAES, A.T. Por dentro da estatística. **Educação Continuada em Saúde: Einstein**, v. 8, p. 1-2, 2010.

R CORE TEAM. 2018. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 27 de maio de 2019.

RAMÍREZ, F.; DAVENPORT, T.L. Mango (*Mangifera indica* L.) flowering physiology. **Scientia Horticulturae**, v.126, p.65-72, 2010.

SANTOS, C.L.R. dos. **Atividade da redutase do nitrato em cana-de-açúcar**. 2013. Tese (Doutorado em Agronomia- Ciência do Solo) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

SANTOS, C.L.R. dos; CAZZETA, J.O.; SARAN, L.M.; SANCHES, A. Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 384-394, 2014.

SANTOS NETO, F. dos; NASCIMENTO, M. N. do; TANAN, T. T.; Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato em folhas de *Physalis angulata* L. In: Anais Seminario de iniciação Científica, 2019. **Anais...** 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA REDUTASE DO NITRATO NAS DIFERENTES FENOFASES DE MANGUEIRA CV. PALMER CULTIVADA NO VALE DO SÃO FRANCISCO²

RESUMO

A redutase do nitrato é a enzima que catalisa a primeira reação de redução no processo de assimilação de nitrato (NO_3^-), principal e maior fonte de nitrogênio (N) na maioria dos solos. Esse elemento é um dos macronutrientes requeridos em maior quantidade pela mangueira (*Mangifera indica* L.) e tem grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade da redutase do nitrato (aRN) ao longo do dia e caracteriza-la em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens de mangueira cv. Palmer, cultivada no Vale do Submédio São Francisco, nos diferentes estádios fenológicos da cultura. A coleta do material vegetal foi realizada em quatro pomares comerciais de mangueira localizados em Petrolina-PE e Maniçoba, distrito de Juazeiro-BA. Em cada fenofase foram coletadas folhas e raízes aleatoriamente de seis plantas dispostas no pomar. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, e a quantificação da aRN baseou-se no método *in vivo* de avaliação. Os dados foram submetidos a ANOVA pelo teste 'F' e as médias comparadas pelo teste de Tukey. A ação da enzima foi maior no período de maior radiação solar, as 10 h. As folhas de 2º fluxo e raízes constituem os principais sítios de assimilação de NO_3^- na cultura da mangueira, podendo haver modulação em função da adubação com fonte de nitrato nas diferentes fases fenológicas. A atividade da enzima foi maior na fase vegetativa do que na reprodutiva e foi favorecida pela aplicação de potássio usado na maturação de ramos e desenvolvimento do fruto.

Palavras-chave: Fenologia. Nitrogênio. Atividade enzimática. *Mangifera indica*.

ABSTRACT

Nitrate reductase is the enzyme that catalyzes the first reaction of reduction during the nitrate assimilation process (NO_3^-), the principal and largest source of nitrogen (N) in most soils. This element is one of the macro nutrients required in more quantity by the mango trees (*Mangifera indica* L.) and has an important influence on the growth and development of the plants. In this view, the objective of this study was to evaluate the nitrate reductase activity (RN_a) throughout the day and it was characterized in leaves of the first and second vegetative flows, and young roots of mango trees cv. Palmer, grown in the sub-middle São Francisco Valley, in different phenological stages of the culture. The collect of vegetal samples was carried out in four commercial mango orchards located in Petrolina-PE and Maniçoba, district of Juazeiro-BA. During each

² Artigo a ser submetido para publicação.

phenophase, leaves and roots were randomly collected from six plants of each orchard. Complete randomized design with four replications was used, and aRN quantification was based on the in vivo evaluation method. The data were submitted to ANOVA by the 'F' test and the means were compared by the Tukey test. The activity of the enzyme was higher in the period of higher solar radiation, at 10 o'clock. Second flow leaf and roots are the main sites of NO_3^- assimilation in mango trees, being possible to have a modulation as function of the fertilization with nitrate source in the different phenological phases. The activity of the enzyme was higher in the vegetative than in the reproductive phase and it was favored by the application of potassium used in fruit maturation and fruit development.

Keywords: Phenology. Nitrogen. Enzymatic activity. *Mangifera indica*.

INTRODUÇÃO

Em condições semiáridas, o cultivo da mangueira pode ocorrer durante todo o ano desde que seja realizado o manejo adequado das plantas com o intuito de favorecer a floração (MOUCO, 2015). No entanto, a produtividade da cultura é relativamente baixa devido a fatores ligados à floração e frutificação, principalmente. Nesse caso, deve-se atentar aos aspectos fisiológicos, fitopatológicos e nutricionais relacionados a esses eventos para que a produção de frutos seja satisfatória (AULAR; NATALE, 2013; COUTINHO; COSTA; PIO, 2016).

Existem ferramentas para o manejo da floração em mangueira por meio da poda, do manejo nutricional e uso de reguladores de crescimento (KRISHNA et al., 2017). A sincronização da vegetação das copas, melhor realizada por poda em todos os ramos da planta, é um primeiro passo necessário no programa de manejo da floração e tem como objetivo deixar os ramos no mesmo estágio fisiológico de maturidade. O próximo passo é a aplicação de paclobutrazol (PBZ) na quantidade e tempo adequado (RAMÍREZ; DAVENPORT, 2010; WONGSRISAKULKAEW et al., 2017). Este, por sua vez, paralisa o crescimento vegetativo e impede a distribuição da seiva elaborada, fazendo com que haja o acúmulo de carboidrato nos ramos, levando-os à maturação (TAIZ et al., 2017).

Para o estímulo bem sucedido do florescimento, sais de nitrato devem ser aplicados, via pulverização foliar, depois que os brotos da mangueira atingirem a maturidade ou idade suficiente para superar qualquer influência

inibitória sobre a resposta de floração (DAVENPORT, 2000). O nitrato de potássio (KNO_3) induz a atividade da redutase do nitrato (aRN), enzima chave na via de assimilação de nitrato para a síntese de aminoácidos, em particular a metionina (ANUSUYA et al., 2018), produto intermediário precursor do etileno que, por sua vez, promove o florescimento na mangueira (SUDHA; BALAMOCHAN; SOORIANATHASUNDARAM, 2012; COUTINHO; COSTA; PIO, 2016).

A redutase do nitrato está localizada no citosol celular e catalisa a redução de nitrato a nitrito (NO_3^- a NO_2^-), etapa limitante na via de assimilação de nitrogênio (N) em aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados nas células, desempenhando papel fundamental na resposta das plantas à deficiência desse elemento (KICHEY et al., 2006, 2007; ANDREWS et al., 2013; KAUR et al., 2015; IMRAN et al., 2019).

A atividade da redutase do nitrato é regulada por diversos fatores como a presença do nitrato, ou seja, seu substrato (COUTINHO et al., 2016; ANUSUYA et al., 2018), a luz (QUEIROZ et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2005; GUILHERME et al., 2019), o estado hídrico (OLIVEIRA et al., 2005), a espécie, a forma de crescimento e o habitat, sendo menor em espécies lenhosas (RAJSZ et al., 2018). A regulação da aRN é necessária para evitar o acúmulo de nitrito que é tóxico para a célula (TAIZ et al., 2017). Além disso, essa regulação tem uma relação próxima com a fotossíntese, pois a etapa de redução de nitrito a amônio utiliza a ferredoxina reduzida, um produto desse processo. Sendo assim, uma diminuição da fotossíntese poderia causar o acúmulo de nitrito no meio celular se a atividade da enzima não fosse regulada (LILLO et al., 2003).

A redução do NO_3^- pode ocorrer no sistema radicular ou na parte aérea das plantas (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000), podendo variar entre as diferentes espécies (BLACK; FUCHIGAMI; COLEMAN, 2002). Oliveira et al. (2005) observaram a atividade da enzima em folhas e raízes de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*), sendo maior nas folhas, bem como foi observado na cultura da videira (MESQUITA et al., 2018). Em milho foi observada uma alternância na aRN entre folhas e raízes, quando a atividade da enzima estava alta nas raízes encontrava-se baixa nas folhas e vice versa

(FREITAS et al., 2007). Na cultura da mangueira (*Mangifera indica* L.) a aRN foi observada em ambos os tecidos vegetais, porém maior nas raízes (SOUZA et al., 2016), sendo o estudo realizado apenas na fenofase da floração.

Na ausência da aRN a redução do NO_3^- não ocorre (KAUFHOLDT et al., 2016) e limita o crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas nas plantas que assimilam esse elemento (SOLOMONSON; BARBER, 1990). Em função do seu papel regulador tem sido correlacionada indiretamente com a produtividade das culturas, sugerindo que plantas com alta aRN tem maior capacidade de resposta à adubação nitrogenada (VIANA, 2007).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi definir o horário de maior atividade da redutase do nitrato e caracterizar a atividade da enzima em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer nas diferentes fases fenológicas da cultura, visando entender como a planta modula o metabolismo do nitrogênio ao longo do seu ciclo.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises laboratoriais foram realizadas nos laboratórios de Química Analítica e Fisiologia Vegetal da Universidade Federal do vale do São Francisco (UNIVASF), *Campus* Ciências Agrárias (CCA), situada na cidade de Petrolina- Pe, no período de dezembro de 2018 a julho de 2019.

A coleta do material vegetal foi realizada em quatro diferentes pomares comerciais de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Palmer. Na tabela 1 estão as informações gerais referentes a cada área estudada.

Tabela 1. Informações gerais referentes às áreas estudadas.

Pomar	Local	Idade (anos)	Espaçamento (m)	Tamanho (ha)	Sistema de Irrigação	Vazão ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)
Área 1	Sebastião da manga	8	5x8	12,54	Gotejo	2
Área 2	Sebastião da manga	8	3,5x6	8,68	Gotejo	2
Área 3	Francês	7	3x6	2	Microaspersão	55
Área 4	Francês	7	4x6	2,2	Microaspersão	45

O clima da região é classificado como Bsh semiárido, com temperatura média anual de 24°C e precipitação anual menor que 700 mm (ÁLVARES et al., 2013). Os dados climáticos referentes à precipitação pluviométrica,

radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar, no período de realização do experimento, foram registrados e obtidos da estação meteorológica automática instalada no *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

As práticas culturais como poda, controle de plantas invasoras, pragas e doenças foram realizadas conforme descritas em Normas técnicas da produção integrada de manga (LOPES et al., 2003). Foi realizada a aplicação de paclobutrazol (PBZ), desponte e quebra de dormência no manejo da indução floral de acordo com as recomendações de Albuquerque et al. (2002). O manejo nutricional foi realizado via fertirrigação de acordo com a análise de solo e foliar, a fim de atender a demanda da cultura (SILVA et al., 2002).

A fim de definir o melhor horário para a coleta do material vegetal foi realizada uma caracterização diurna da aRN. Para tal, folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens foram coletadas ao longo do dia a cada duas horas, iniciando 8 h e finalizando às 16 h, período de livre acesso às fazendas. A aRN foi monitorada nos diferentes estádios fenológicos da mangueira e a coleta do material para essa etapa foi realizada no horário de maior atividade, definido a partir da caracterização diurna. Na tabela 2 está descrito o local de coleta referente a cada fenofase.

Tabela 2. Fenofases da cultura da mangueira objeto da coleta de material para análises de atividade da enzima redutase do nitrato e respectivos locais de coleta de folhas e raízes.

Fenofases	Pomar			
	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Pré-poda	X			
Poda	X			
PBZ (12 DAA)			X	
PBZ (32 DAA)				X
Maturação		X		
Pré-indução		X		
Indução floral		X		
Florescimento		X		
Frutificação		X		

Obs.: Área 1 e 2= Sebastião da manga (Petrolina-Pe); Área 3 e 4= Francês (Maniçoba-Ba).

O material vegetal foi obtido de seis plantas amostradas ao acaso dentro do mangueiral. Da porção mediana de cada planta foram coletadas duas folhas de 1º fluxo (penúltimo fluxo vegetativo) e duas folhas de 2º fluxo (último fluxo vegetativo) expostas à radiação solar, como representado na figura 1,

totalizando 12 folhas de cada tipo, e uma porção de raízes finas (absorventes) na profundidade de 0-10 cm na faixa irrigada do solo.

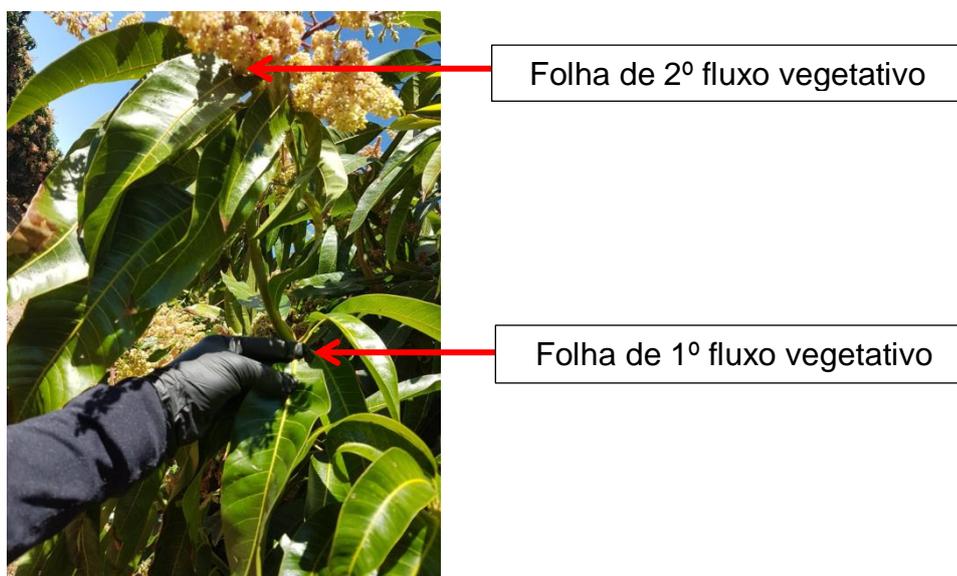


Figura 1. Detalhe das folhas de mangueira de 1º e 2º fluxo vegetativo coletadas para a quantificação da atividade da enzima redutase do nitrato.

Folhas e raízes foram armazenadas em sacos plásticos e papel alumínio, respectivamente, ambos acondicionados em caixa térmica contendo gelo.

A atividade da redutase do nitrato (aRN) *in vivo* foi determinada de acordo com o método descrito por Majerowicz et al. (2003) com algumas alterações. As folhas passaram por uma sequência de lavagem com água corrente, detergente 1%, água corrente e água destilada, nessa ordem. Enquanto as raízes foram lavadas em peneira somente com água corrente e água destilada para evitar a perda do material vegetal.

Após secagem, foram retirados discos de 7 mm do limbo foliar formando uma amostra composta para os dois tipos de folha. Cada amostra simples analisada conteve 60 discos e foi pesada para obtenção da massa. As raízes foram picadas em fragmentos pequenos formando uma amostra composta. Cada amostra simples conteve 0,5 g de raiz. As porções de folhas e raízes foram depositadas em tubos falcon envolto com papel alumínio, aos quais foram adicionados 4 mL da solução tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5, nitrato de potássio (KNO₃) 0,05 M e n-propanol 1%. Em seguida, o tecido vegetal submerso na solução foi submetido a três sessões de vácuo, cada uma

de 1 minuto (min) com intervalos de 30 segundos (s). Os tubos foram devidamente fechados e incubados por 60 minutos à temperatura de 30 °C.

Após o período de incubação, os tubos foram submetidos à imersão em gelo por dois minutos. A quantidade de nitrito (NO_2^-) liberada no meio de incubação foi determinada em alíquotas de 2 mL com a adição de 1 mL de N-naftil-etileno-diamino a 0,2% (m/v) e 1 mL de Sulfanilamida a 1% (m/v), que reagiu por trinta min. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS marca EVEN a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em μmol de nitrito liberado por 1 g de folha fresca por hora de incubação ($\mu\text{mol}.\text{NO}_2^-.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), calculada com base em equação linear obtida por meio da curva padrão de nitrito, previamente preparada.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$ utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da redutase do nitrato (aRN) em mangueira cv. Palmer foi observada ao longo do dia em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens, indicando dois sítios de assimilação de N (parte aérea e raiz) (Figura 2).

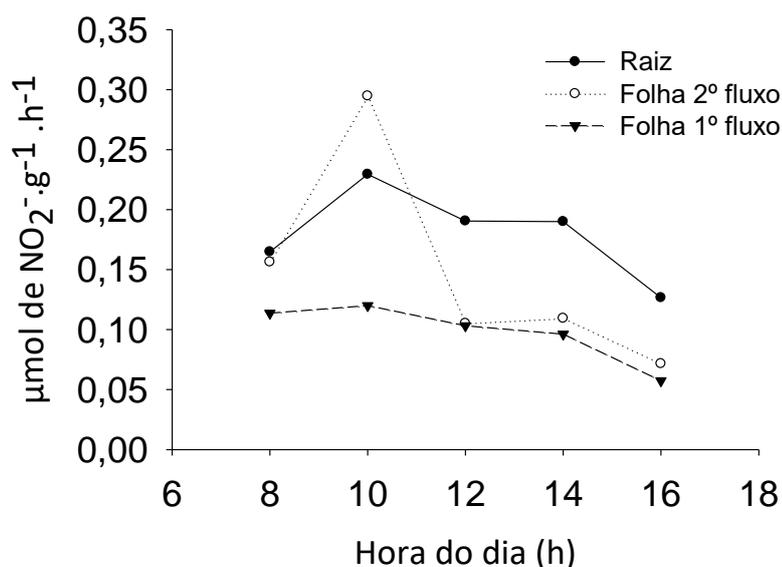


Figura 2. Variação diurna da atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer.

Para folhas de 2º fluxo e raízes, a aRN pôde ser observada a partir das primeiras horas da manhã com um pico às 10 h, diminuindo a partir do meio dia. As folhas de 1º fluxo apresentaram uma pequena variação na atividade da enzima no período da manhã, sem pico evidente de atividade nos horários monitorados, mas com igual tendência de redução da aRN a partir do meio dia (Figura 1). É possível observar que o pico de atividade coincidiu com o horário de maior radiação solar (Figura 3).

Comportamento semelhante ao observado no presente estudo foi reportado por Oliveira et al. (2005) em folhas de pupunheira (*Bactris gasipaes*), na qual máxima atividade da aRN também foi verificado as 10 h, após três horas do início do período luminoso. Além disso, os autores também observaram declínio na atividade da enzima após esse horário. Adicionalmente, em laranjeiras (*Citrus sinensis*) cv. Valência, a máxima aRN também foi observada nesse mesmo horário, correspondendo com à máxima fotossíntese (DOVIS et al., 2014). Esse comportamento se deve ao efeito da luz sobre a atividade da enzima, que pode ser direto, na sua ativação, ou indireto, via processo fotossintético, que fornece a energia necessária para a assimilação do nitrato (MARTUSCELLO et al., 2016).

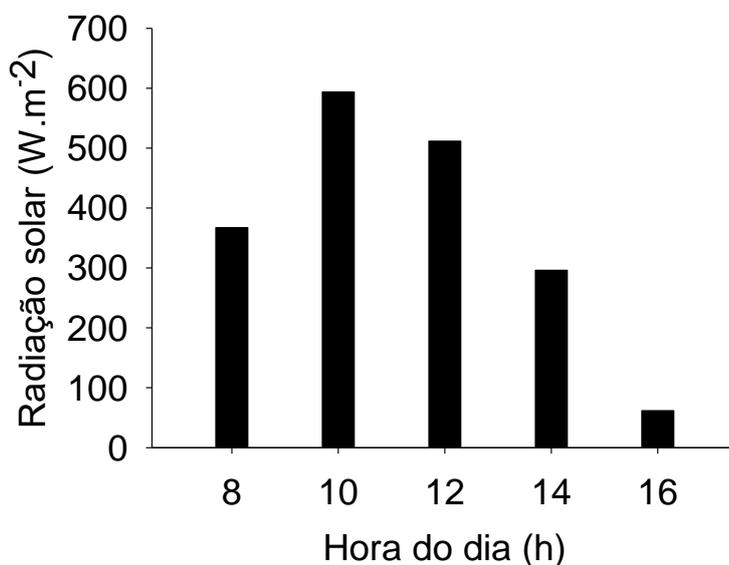


Figura 3. Valores médios de radiação solar obtidos da estação meteorológica da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), *Campus* de Ciências Agrárias (CCA), em diferentes dias e fases fenológicas da mangaieira (*Mangifera indica* L.).

Dos fatores climáticos monitorados no dia do ensaio, a radiação solar parece ter sido o que mais influenciou a atividade da redutase do nitrato.

Santos et al. (2014) inferiram que a enzima é mais ativa nos horários de maior intensidade de radiação solar global e que os níveis mais baixos da aRN obtidos no início da manhã e no final do dia podem estar ligados a um mecanismo de controle rápido da atividade dessa enzima que, de acordo com Taiz et al. (2017), pode ser por meio da fosforilação e desfosforilação, uma modificação pós-traducional regulada pela luz.

Segundo Khouri (2007), os maiores valores de aRN e provavelmente maior absorção de NO_3^- , ocorrem durante os períodos de alta temperatura e demanda evaporativa. Essas condições podem aumentar o influxo de água e NO_3^- para as folhas, favorecendo a atividade da enzima nesses tecidos, pois o NO_3^- é translocado para a parte aérea via xilema por fluxo transpiratório (TAIZ et al., 2017), aumentando assim a disponibilidade do substrato para a enzima.

Foi realizado o monitoramento da atividade da redutase do nitrato nas diferentes fenofases na cultura da mangueira e verificou-se, após a colheita e antes da realização da poda (pré-poda), maior atividade da redutase do nitrato na raiz, diferindo estatisticamente das folhas de 1º e 2º fluxo que não diferiram entre si (Figura 4). Pode-se observar que após a realização da poda não foi quantificada a aRN em folhas de 2º fluxo porque esse manejo retira esse material. De forma geral, o nitrato absorvido pelas raízes pode ser assimilado nos tecidos radiculares ou nos tecidos foliares, dependendo da sua disponibilidade (OLIVEIRA et al., 2011).

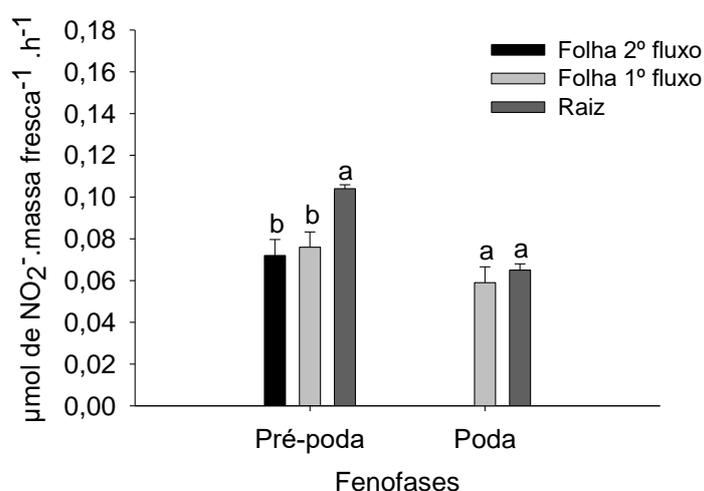


Figura 4. Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de mangueira cv. Palmer nas fases de pré-poda e poda, nos dias 14/04/2019 e 29/04/2019 respectivamente, na área 1 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-PE.

As plantas em estudo não receberam adubação nitrogenada via fertirrigação ou foliar após a colheita, podendo esse ser um fator para a baixa atividade da enzima nas folhas de 1º e 2º fluxo. Além disso, a baixa aRN nesses tecidos pode ter ocorrido em função das baixas concentrações de NO_3^- devido à exportação de N pelos frutos colhidos na safra anterior, um a dois meses antes, no máximo, pois esse elemento é o segundo macronutriente mais extraído pela colheita na cultura da mangueira (NASCIMENTO et al., 2005).

Acredita-se que a maior atividade da enzima nas raízes pode ter sido em função das aplicações de nitrato de cálcio, via fertirrigação, realizadas durante o desenvolvimento do fruto no ciclo anterior e que não foi requerido pela planta, sendo armazenado nos vacúolos radiculares para posterior metabolização. Segundo Prado (2013), as frutíferas assimilam NO_3^- principalmente nas raízes, havendo incremento nas folhas quando há um aumento na disponibilidade desse elemento. A mangueira parece apresentar uma grande capacidade armazenadora de substâncias de reservas, além de possuir um sistema radicular que apesar de pouco denso, ocupa um grande volume de solo (CASTRO NETO, 1995). Já na cultura da videira, as folhas jovens apresentaram uma elevada atividade da redutase do nitrato após a colheita, o que foi assemelhado ao acúmulo de sacarose e amido (HUNTER; RUFFNER, 1997). Segundo esses autores, o aumento na atividade da enzima poderia estar relacionado ao acúmulo anual de nitrogênio na cultura. Essa diferença entre a mangueira e videira pode ser em função do manejo de N no ciclo anual. Além do que a localização do tecido de assimilação de nitrato em plantas varia de acordo com a espécie e pode indicar diferentes adaptações ecológicas (BLACK; FUCHIGAMI; COLEMAN, 2002).

Aos 15 dias após a poda, independente do material vegetal avaliado, a redutase do nitrato apresentou atividade estatisticamente igual (Figura 4). Na poda de produção, realizada após a colheita, os principais objetivos são realizar a limpeza de ramos secos e doentes, além da abertura central da planta para promover maior iluminação na parte interna, favorecendo o crescimento vegetativo para a próxima colheita, desse modo, todos os recursos são direcionados para o crescimento vegetativo (MOUCO, 2015; WOLSTENHOLME; WHILEY, 1990). Após esse trato cultural foi realizada

adubação nitrogenada nas plantas, porém, não foi observado aumento na aRN nos tecidos vegetais. Esse fato pode ser porque a fonte de N disponibilizada foi sulfato de amônio que não contém nitrato (NO_3^-) na sua composição, o principal substrato para a ativação da enzima (MARTUSCELLO et al., 2016). De um modo geral, sulfato de amônio e uréia são as principais fontes de N disponibilizadas nessa fase para a cultura da mangueira. Sais de nitrato são aplicados na fase de quebra de dormência de gemas, via foliar, e na fase de desenvolvimento dos frutos, via fertirrigação.

A fim de inibir o crescimento dos ramos e promover a maturação das gemas, é realizada aplicação de paclobutrazol (PBZ), um regulador de crescimento que aumenta o potencial da planta em produzir brotos reprodutivos (DAVENPORT, 2007). Na fase de travamento da planta, verificou-se um aumento na aRN nas folhas em detrimento das raízes. Aos 12 dias após a aplicação (DAA) do PBZ a maior aRN foi encontrada nas folhas de 1º fluxo que foi estatisticamente diferente apenas das raízes. Folhas de 2º fluxo e raízes não diferiram entre si (Figura 5). Aos 32 DAA, a atividade da enzima foi maior em folhas de 1º e 2º fluxo não diferindo estatisticamente entre si, porém, diferindo das raízes (Figura 5).

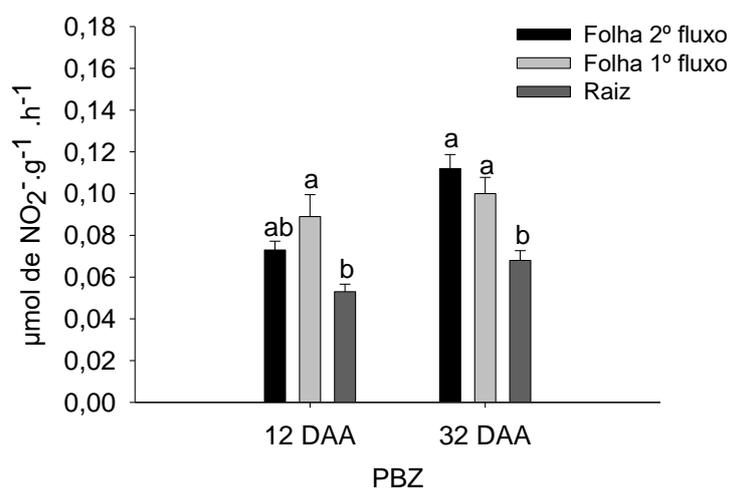


Figura 5. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer aos 12 e 32 dias após a aplicação de paclobutrazol, no dia 22/01/2019, nas áreas 3 e 4, respectivamente, da fazenda Francês em Maniçoba-BA.

O PBZ é um regulador de crescimento e tem sido amplamente utilizado na mangicultura com o objetivo de restringir o crescimento vegetativo, propiciar o acúmulo de carboidratos e promover a floração. Basicamente, funciona bloqueando a síntese de giberelina (SANTOS, 2017) que inibe o florescimento

e estimula o crescimento vegetativo (TAIZ et al., 2017). A menor atividade da enzima nas raízes em ambos os dias analisados nessa fase, pode estar relacionada à menor atividade metabólica no sistema radicular, uma vez que o PBZ é aplicado via sistema radicular, afetando o crescimento das raízes e consequente redução da força de dreno, afetando a demanda e o consumo de energia, pois o dispêndio energético para a redução do NO_3^- nos tecidos radiculares é elevado e as raízes são consideradas sítios de assimilação menos eficientes do que a parte aérea (CARELLI; FAHL, 1991), visto que as folhas são o centro de síntese de ATP e agentes redutores (BLOOM; SUKRAPANNA; WARNER, 1992).

A maior aRN nas folhas de 1º e 2º fluxo pode estar relacionada ao aumento no teor de carboidrato nesses locais, fonte primordial de energia, mesmo que a maior parte dos açúcares seja direcionada para a maturação dos ramos, pois a disponibilidade de carboidratos aumenta a taxa de redução de nitrato (KLEPPER; FLESHER; HAGEMAN, 1971). Embora a aplicação de PBZ diminua o potencial hídrico na raiz e, conseqüentemente, reduz as taxas transpiratórias, a dose adequada do produto não deve diminuir a produção de fotoassimilados (SOUZA et al., 2016), fazendo a manutenção do metabolismo vegetal nessas condições, o que parece ter ocorrido nas plantas em estudo ao observar que a redutase do nitrato manteve a sua atividade, principalmente considerando que a demanda por compostos nitrogenados deve diminuir desta fase de travamento do crescimento da planta, na qual não há geração de tecidos novos.

Souza et al. (2016) caracterizaram a atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de mangueira cv. Palmer, após aplicação de PBZ via irrigação e encontraram uma maior atividade no sistema radicular, diferente do que foi observado no presente trabalho. Além disso, observaram que não houve efeito significativo do método de aplicação e das doses de PBZ via irrigação sobre a aRN.

Na fase de maturação de ramos a aRN foi estatisticamente igual nas folhas de 2º fluxo e raízes, sendo bem superior às folhas de 1º fluxo que diferiu estatisticamente dos demais tecidos vegetais (Figura 6). Para a maturação dos ramos é comum utilizar o sulfato de potássio (K_2SO_4) a 3% em duas ou três

pulverizações foliares, após a maturação das folhas, mais ou menos 60 dias após a aplicação de PBZ, com intervalo de sete dias entre as aplicações (SANTOS, 2017). Nas plantas em estudo foram realizadas quatro aplicações com K_2SO_4 .

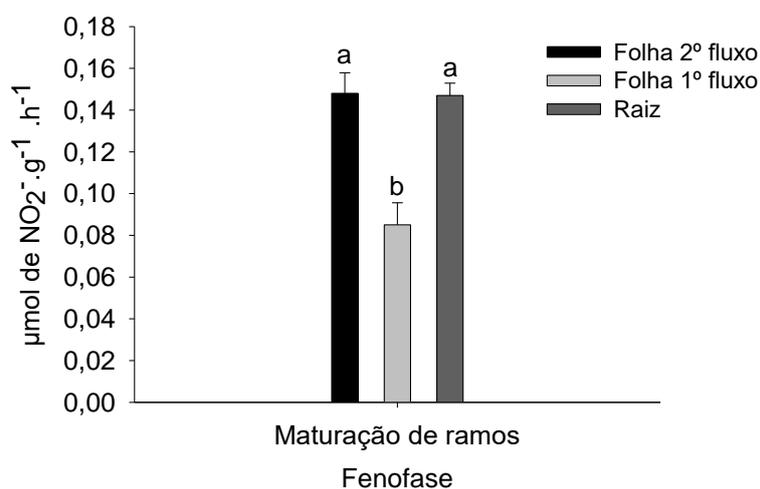


Figura 6. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer na fase de maturação de ramos um dia após a segunda aplicação de sulfato de potássio (K_2SO_4), 14/12/2019, na área 2 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-PE.

Vale ressaltar que o potássio (K) é constituinte do produto utilizado. Foi observado na cultura do pepino que depois do N, o K é o nutriente que determina a maior ativação da redutase do nitrato e, conseqüentemente, a redução do NO_3^- (RUIZ; ROMERO, 2000). Esse íon interfere na relação potássio/nitrogênio inibindo o crescimento vegetativo e colaborando com a maturação dos ramos em mangueira, melhorando assim a fertilidade da gema (SILVA; VILELA, 2004). Além disso, aumenta a síntese de carboidrato em razão da sua contribuição na fotossíntese, o que favorece a translocação desses fotoassimilados (MARSCHNER; MARSCHNER, 2012).

O K é um íon osmoticamente ativo envolvido na osmorregulação das células-guarda. Sua concentração nessas células é responsável pelos mecanismos de abertura e fechamento estomático (ANDRÉS et al., 2014; TAIZ et al., 2017). O aumento na concentração de K nas células-guarda reduz o seu potencial osmótico, permitindo a entrada de água e, em função do elevado turgor celular os estômatos se abrem (TAIZ et al., 2017). Desse modo, há um

aumento na condutância estomática e isso pode favorecer o transporte de NO_3^- para a parte aérea, induzindo uma maior atividade da redutase do nitrato nas folhas de 2º fluxo. Segundo Ruiz e Romero (2002), o K facilita a absorção e transporte de NO_3^- para a parte aérea da planta, o que explica o aumento da aRN com o incremento desse elemento nas folhas de 2º fluxo.

Além disso, as folhas de 1º fluxo apresentaram aRN inferior. Folhas de 2º fluxo são drenos mais fortes em detrimento às de 1º fluxo, apresentando uma taxa transpiratória maior (TAIZ et al., 2017) e, conseqüentemente, recebendo mais substrato, ativando a redutase do nitrato e favorecendo a sua atividade (SANTOS, 2010; TAIZ et al., 2017). Alternativamente, a diminuição na atividade da enzima com a idade da folha pode ser atribuída a mudanças na atividade metabólica geral com a ontogênese foliar (BLACK; FUCHIGAMI; COLEMAN, 2002). Esse fato já foi demonstrado em folhas de mangueira variedade Dasehri, originária da Índia (ANANTHANARAYANAN; CHACKO, 1983), em que a aRN apresentou-se elevada na fase inicial de desenvolvimento da folha com posterior redução e estabilização.

Outro manejo realizado no processo de indução floral é a redução da lâmina de irrigação junto com a maturação de ramos. O déficit hídrico diminui a atividade da redutase do nitrato devido à diminuição do fluxo de água pela corrente transpiratória e, conseqüentemente, o fluxo de nitrato para as folhas (OLIVEIRA et al., 2011), visto que a enzima é altamente dependente do seu substrato. No entanto, esse manejo não pareceu interferir na aRN das folhas de 2º fluxo e raízes, talvez porque quando a análise foi realizada a lâmina de irrigação estava reduzida em 25% do total aplicado, não sendo ainda um fator limitante à atividade da enzima. Além da pulverização foliar com fonte potássica, eficiente em favorecer a atividade da enzima.

A quebra de dormência é feita por meio da pulverização foliar de sais de nitrato para estimular a brotação reprodutiva (JAMEEL et al., 2018). Nas plantas estudadas foi utilizado o nitrato de potássio (KNO_3) para esse fim. Esse elemento desencadeia a formação da redutase do nitrato, que reduz o nitrato e leva à síntese de aminoácidos, em especial a metionina que é precursor do etileno. Este, por sua vez, induz a floração (COUTINHO; COSTA; PIO, 2016). Pode-se observar que a aRN sofreu influência da pulverização foliar com KNO_3

em folhas de 2º fluxo e raízes de mangueira. As folhas de 1º fluxo apresentaram pouca alteração no teor da atividade da enzima nos períodos pré e pós indução floral (Figura 7).

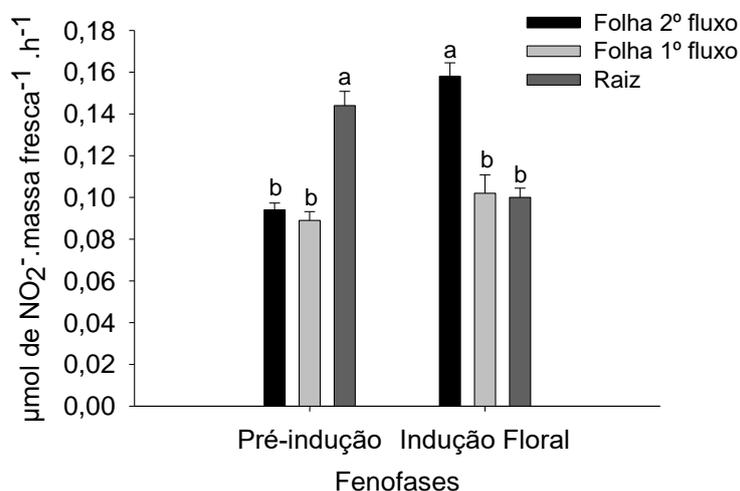


Figura 7. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer nas fases de pré-indução e indução floral, dia 08/01/2019 e 15/01/2019 respectivamente, na área 2 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-Pe.

Na pré-indução, a maior aRN ocorreu na raiz, diferindo estatisticamente das folhas de 1º e 2º fluxo que não diferiam entre si. Após a indução, houve uma queda na aRN radicular, igualando às folhas de 1º fluxo, e um aumento da atividade da enzima nas folhas de 2º fluxo, tornando esse o principal sítio de redução de NO_3^- em mangueira após o incremento exógeno de KNO_3 , via foliar. Isso sugere uma capacidade de modulação na aRN pela planta em função da aplicação de sais de nitrato (TAIZ et al., 2017), pois a enzima é induzida pelo seu substrato (MARTUSCELLO et al., 2016), o que pode explicar o aumento da atividade nas folhas de 2º fluxo após a pulverização ao comparar com as raízes. De acordo com Konishi e Yanagisawa (2011), a expressão dos genes NR é rapidamente estimulada em várias plantas na presença de NO_3^- .

Há relato de que em folhas e raízes de videira houve aumento na aRN na presença de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), sendo evidente que a parte aérea é o sítio preferencial de assimilação de N nessa cultura (MESQUITA et al., 2018), bem como em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*) (OLIVEIRA et al., 2005). Já em plantas jovens de café (*Coffea arabica* L.) irrigadas com soluções contendo diferentes concentrações de nitrato, a aRN foi maior nas raízes do que nas folhas (CARELLI; FAHL, 1991).

A preferência quanto ao sítio de redução do nitrato pode variar de acordo com a espécie, mas não é constante, pois é influenciada por fatores ambientais e fisiológicos (ANDREWS, 1986), como, por exemplo, o regime de irradiância, de modo que no período de maior radiação fotossinteticamente ativa (RFA), a redução do nitrato é maior nas folhas em relação às raízes, e quando há redução na RFA, a aRN fica mais concentrada no tecido radicular (CARELLI; FAHL, 2006). Os tecidos fotossintetizantes são o local mais adequado para a redução do nitrato devido o seu consumo energético, fato esse discutido anteriormente, no entanto, há muitos relatos de aRN em tecidos radiculares (MARTUSCELLO et al., 2016), como no presente trabalho.

A diminuição da aRN na raiz na fase de indução floral e nas fases subsequentes (Figuras 7, 8 e 9) também pode estar relacionada com a quantidade de energia disponibilizada nesses tecidos em função do investimento de energia na formação de panículas e frutos, sendo nesse caso drenos mais fortes que as raízes nessas fenofases (TAIZ et al., 2017).

Na fase de floração a aRN encontrada nas folhas de 2º fluxo foi significativamente superior em relação às folhas de 1º fluxo e raízes (Figura 8). Embora haja essa diferença entre os materiais vegetais, pode-se observar que a aRN já começa a reduzir nas folhas de 2º fluxo em comparação com a fase anterior. A exigência da mangueira em nitrogênio aumenta com a idade e o estágio fisiológico da planta durante o ano agrícola. Antes da floração tem-se os maiores teores de nitrogênio, enquanto que na floração plena e formação de frutos encontram-se teores mais baixos (NASCIMENTO et al., 2005).

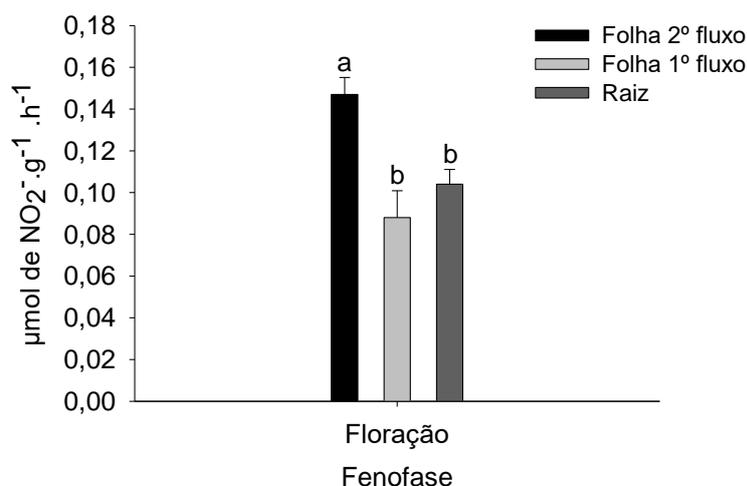


Figura 8. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 2º e 1º fluxo vegetativo e raízes de mangueira cv. Palmer na fase de floração plena, dia 23/02/2019, na área 2 da fazenda de Sebastião da manga em Petrolina-Pe.

Mudanças no teor foliar de N e na capacidade fotossintética durante o desenvolvimento da planta podem resultar da depleção de N por drenos como flores e frutos (URBAN et al., 2004), podendo ser essa a causa do início da redução da atividade da enzima nas folhas de 2º fluxo, mais próximas às inflorescências, agindo como fonte de carboidratos (energia) para o desenvolvimento de flores e frutos, consequentemente reduzindo a aRN nesse local, pois as taxas fotossintéticas das plantas são fundamentais para o aumento da atividade da enzima (HUNTER; RUFFNER, 1997). Souza et al. (2016) observaram em mangueira Palmer que, na fase de floração, houve uma diminuição no teor de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas totais e no teor de sacarose e inferiu que isso pode ter ocorrido devido à demanda energética para a formação de inflorescências, relação fonte/dreno.

Na fase de frutificação a aRN foi maior em folhas de 2º fluxo, seguida de raízes e menor em folhas de 1º fluxo (Figura 9). Embora tenha sido maior em folhas de 2º fluxo, a atividade da enzima continuou reduzindo em comparação com as fases anteriores. Nesse estágio continua a remobilização de N foliar para o desenvolvimento dos frutos.

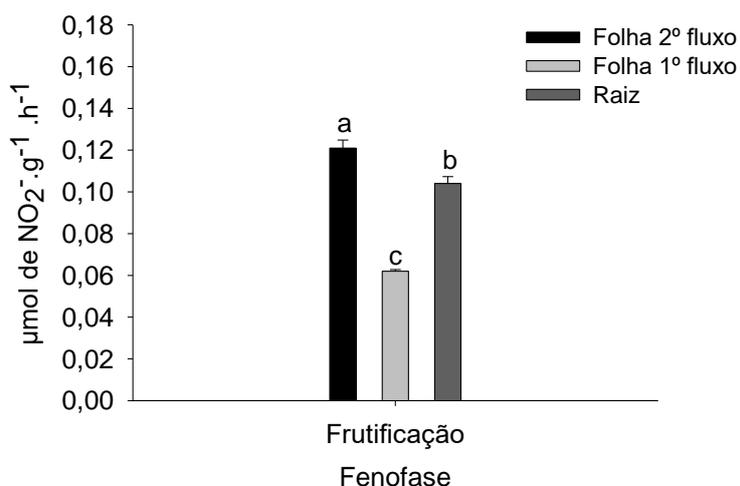


Figura 9. Atividade da redutase do nitrato em folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo, e raízes jovens de mangueira cv. Palmer na fase de frutificação, dia 18/04/2019, na área 2 da fazenda Sebastião da manga em Petrolina-Pe.

Barras com mesma letra dentro da fase não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A degradação de proteínas foliares gera uma maior quantidade de aminoácidos que atuam como reguladores diminuindo a aRN, provavelmente pela inibição da ação dos transportadores de NO₃⁻ na membrana plasmática, pois, aminoácidos circulantes no floema podem controlar a taxa de absorção de NO₃⁻ pelas raízes (IMSANDE; TOURAINE, 1994). Esse fato pode justificar a menor atividade em folhas de 1º fluxo pela fase mais avançada de desenvolvimento e, conseqüentemente, maior degradação de proteínas.

Quanto às raízes, há pouca variação na atividade da enzima entre as fases de indução floral, floração e frutificação (Figuras 7, 8 e 9). Sugere-se que isso pode ser devido à aplicação de nitrato de cálcio, via solo, realizada quando as plantas apresentaram a florada definida e frutos em fase de chumbinho, que atuou como substrato disponível para a manutenção da aRN nas raízes e incremento na parte aérea durante essas fenofases, sendo as folhas de 2º fluxo o sítio preferencial de redução e assimilação de NO₃⁻ na cultura da mangueira nesses estádios fenológicos.

Outro fator que pode ter contribuído com a manutenção da atividade da redutase do nitrato na parte aérea na fase de frutificação foi a adubação via solo com sulfato de potássio e cloreto de potássio, realizada no pomar, na fase de desenvolvimento de fruto. De acordo com Ruiz e Romero (2002), a aplicação de fertilizante à base de K facilita a captação e transporte de NO₃⁻

para a parte aérea da planta, pois esse elemento é um cátion de acompanhamento do NO_3^- no xilema (BLEVINS, 1985).

Pode-se observar que a atividade total da redutase do nitrato, em folhas e raízes de mangueira, é menor durante a fase vegetativa. Na poda não há compensação por parte das folhas de 1º fluxo e raízes na atividade da enzima em função da eliminação das folhas de 2º fluxo. O aumento na aRN a partir dos 32 dias após a aplicação do PBZ parece ser em função do suprimento com fonte potássica, que favorece a absorção e transporte de NO_3^- na planta e, conseqüentemente a atividade da enzima. Na fase reprodutiva a aRN mantém o nível mais elevado e coincide com a aplicação de fertilizante nítrico via foliar e fertirrigação. A atividade da enzima então começa a reduzir a partir da floração, sendo verificado no final da frutificação nível semelhante ao observado no início do ciclo, ou seja, na fase de pré-poda (Figura 10).

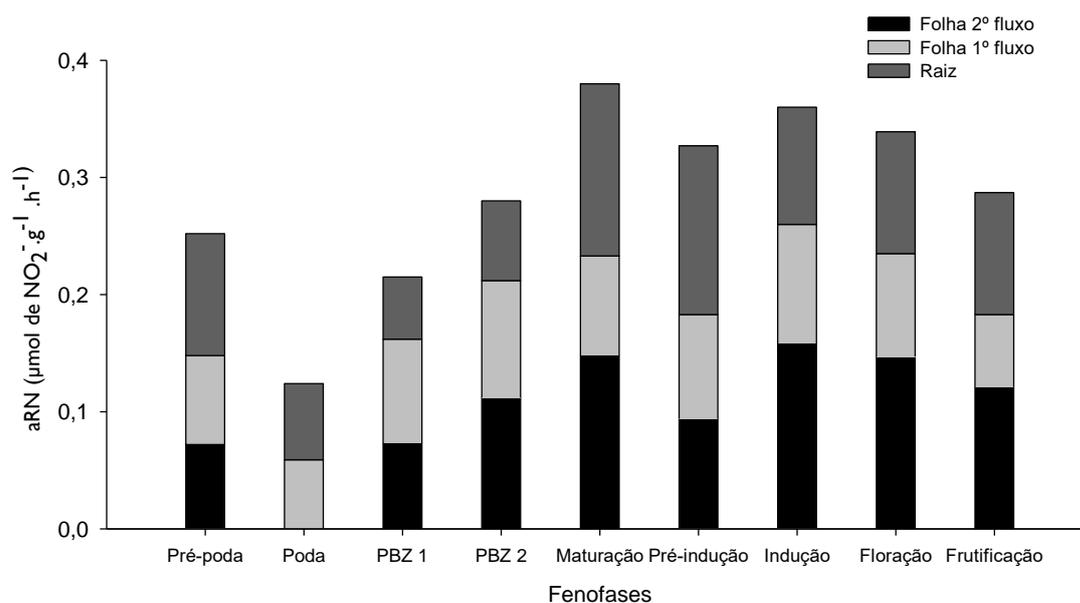


Figura 10. Atividade total da redutase do nitrato em mangueira cv. Palmer nas diferentes fenofases.

PBZ 1: 12 dias após aplicação de PBZ; PBZ 2: 32 dias após a aplicação do PBZ; aRN: atividade da redutase do nitrato em $\mu\text{mol de NO}_2^- \cdot \text{massa fresca}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A nutrição pode afetar a produtividade da cultura da mangueira. A absorção de nutrientes pela cultura varia em função da idade e do estágio fenológico da planta. Por esse motivo é importante conhecer a dinâmica dos nutrientes nas diversas partes da planta, ao longo do cultivo, a fim de fornecer subsídios para adequar programas de adubação para a cultura (ORDÓÑEZ, 2011).

CONCLUSÕES

A atividade da redutase do nitrato em mangueira cv. Palmer é influenciada por fatores ambientais, principalmente pela radiação solar. Para a obtenção da maior atividade da enzima em tecidos foliares e radiculares, recomenda-se a coleta do material vegetal em torno das 10 h. As folhas de 2º fluxo e raízes constituem os principais sítios de atividade da redutase do nitrato, podendo haver modulação de acordo com uso de fonte de nitrato via foliar ou fertirrigação nas diferentes fases fenológicas na cultura da mangueira, enquanto em folhas de 1º fluxo não há alteração em função da adubação com fonte nítrica. Na fase vegetativa a atividade da enzima é menor do que na fase reprodutiva. O uso de fonte potássica no processo de maturação de ramos e desenvolvimento do fruto favorece a atividade da redutase do nitrato.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J. A. S.; MEDINA, V. D.; MOUCO, M. A. C. Indução floral. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.259-276.

ÁLVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Climate classification map for Brazil. **Meteorologische zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ANANTHANARAYANAN, T.V.; CHACKO, E.K. Studies on nitrate reductase in *Mangifera indica* L. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 64, p. 121-128, 1983.

ANDRÉS, Z.; PÉREZ-HORMAECHE, J.; LEIDE, E.O.; SCHLÜCKING, K.; STEINHORST, L.; MCLACHLAN, D.H.; SCHUMACHER, K.; HETHERINGTON A.M.; KUDLA, J.; CUBERO, B.; PARDO, J.M. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 111, n. 17, p. 1806-1814, 2014.

ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 9, p. 511–519, 1986.

ANDREWS, M.; RAVEN, J.A.; LEA, P.J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, v.163, p.174 –199, 2013.

ANUSUYA, R.; VIJAYAKUMAR, R.M.; SRIVIDHYA, S.; SIVAKUMAR, R. Comparison of physiological and flowering parameters of main and off season by using different plant nutrients and growth hormone in mango (*Mangifera*

indica L.) cv. Bangalora. **Journal of Agriculture and Ecology**, v.5, p.76-82, 2018.

AULAR, J.; NATALE, W. Nutrição mineral e qualidade do fruto de algumas frutíferas tropicais: goiabeira, mangueira, bananeira e mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1214-1231, 2013.

BLACK, B.L.; FUCHIGAMI, L.H.; COLEMAN, G.D. Partitioning of nitrate assimilation among leaves, stems and roots of poplar. **Tree Physiology**, v. 22, n. 10, p. 717-724, 2002.

BLEVINS, D.G.; Role of potassium in protein metabolism in plants. In: MUNSON, R.D. **Potassium in agriculture**. USA: Madison, WI: American Society of Agronomy, 1985, p. 413-424.

BLOOM, A.J.; SUKRAPANNA, S.S.; WARNER, R.L. Root Respiration Associated with Ammonium and Nitrate Absorption and Assimilation by Barley. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1294-1301, 1992.

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

CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Distribuição da assimilação de nitrato e de matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 1, p. 29-37, 1991.

CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Partitioning of nitrate reductase activity in *Coffea arabica* L. and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 3, p. 397-406, 2006.

CASTRO NETO, M.T. Aspectos fisiológicos da mangueira sob condições irrigadas. EMBRAPA. In: **Informações técnicas sobre a cultura da manga no semi-árido brasileiro**. 1995. 173p.

COUTINHO, G.; COSTA, I. de J.S.; PIO, L.A.S. **Indução floral em mangueira (*Mangifera indica* L.)**. Boletim técnico, Lavras, n. 101, p. 1-22, 2016.

DAVENPORT, T.L. Processes Influencing Floral Initiation and Bloom: The Role of Phytohormones in a Conceptual Flowering Model. **HortTechnology**, v. 10, p. 733-739, 2000.

DAVENPORT, T.L. Reproductive physiology of mango. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 363-376, 2007.

DOVIS, V.L.; HIPPLER, F.W.R.; SILVA, K.I.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; MATTOS JUNIOR, D. Optimization of the nitrate reductase activity assay for citrus trees. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 383-390, 2014.

FREITAS, R.B. de; ALVES, J.D.; MAGALHÃES, M.M.; GOULART, P. de F.P.; NASCIMENTO, M.N. do; FRIES, D.D. Adubação do cafeeiro com nitrato de potássio via solo e folha, no outono-inverno e primavera-verão: efeitos na atividade da redutase do nitrato, no crescimento das plantas e na produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 945-952, 2007.

GUILHERME, E.A.; CARVALHO, F.E.L.; DALOSO, D.M.; SILVEIRA, J.A.G. Increase in assimilatory nitrate reduction and photorespiration enhances CO₂ assimilation under high light-induced photoinhibition in cotton. **Environmental and Experimental Botany**, v. 159, p. 66-74, 2019.

HAMILTON, D.; MARTIN, C.; BENNET, M.; HEARNDEN, M.; ASIS, C.A. Effect of tree leaf N status and N application time on yield and fruit N partitioning of mango. **Acta Horticulturae**, v. 1183, p. 161-166, 2017.

HUNTER, J.J.; RUFFNER, H.P. Diurnal and seasonal changes in nitrate reductase activity and nitrogen content of grapevines: Effect of canopy management. **Vitis**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 1997.

IBELL, P.; BALLY, I.S.E.; WRIGHT, C. L.; MADDOX, C. When is the best time to apply postharvest nitrogen fertiliser?. **Acta Horticulturae**, v. 1183, p. 153-160, 2017.

IMRAN, M.; SUN, X.; HUSSAIN, S.; ALI, U.; RANA, M.S.; RASUL, F.; SALEEM, M.H.; MOUSSA, M.G.; BHANTANA, P.; AFZAL, J.; ELYAMINE, A.M.; HU, C.X. Molybdenum-Induced Effects on Nitrogen Metabolism Enzymes and Elemental Profile of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Under Different Nitrogen Sources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 1-17, 2019.

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

JAMEEL, M.A.; NAIK, S.R.; MADHUMATHI, C.; REDDY, D.S.; VENKATARAMANA, K.T. Physiology of flowering in mango. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 6, p. 2375-2382, 2018.

KAUFHOLDT, D.; BAILLIE, C.K.; MEYER, M.H.; SCHWICH, O.D.; TIMMERER, U.L.; TOBIAS, L.; THIEL, D.V.; HANSCH, R.; MENDEL, R.R. Identification of a protein-protein interaction network downstream of molybdenum cofactor biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, n.207, p.42-50, 2016.

KAUR, G.; ASTHIR, B.; BAINS, N. S.; FAROOQ, M. Nitrogen nutrition, its assimilation and remobilization in diverse wheat genotypes. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.17, n.3, p.531-538, 2015.

KHOURI, C.R. **Atividade da redutase do nitrato, teores de nitrogênio e de carboidratos em cafeeiro influenciados pelo sombreamento e estágio**

fenológico. 52p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

KICHEY, T.; HEUMEZ, E.; POCHOLLE, D.; PAGEAU, K.; VANACKER, H.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J.; HIREL, B. Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat highlight a central role for glutaminesynthetase. **New Phytologist**, v.169, p.265-278, 2006.

KICHEY, T.; HIREL, B.; HEUMEZ, E.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlate with agronomic traits and nitrogen physiological markers. **Field Crops Research**, v.102, p.22-32, 2007.

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. The Regulatory Region Controlling the Nitrate-Responsive Expression of a Nitrate Reductase Gene, NIA1, in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 5, p. 824-836, 2011.

KLEPPER, L.; FLESHER, D.; HAGEMAN, R.H. Generation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide for Nitrate Reduction in Green Leaves. **Plant Physiology**, v. 48, p. 580-590, 1971.

KRISHNA, B.; VYAVAHARE, S.N.; CHAUDHARI, R.S.; SUBRAMANIAM, V.; SANE, P.V. Roles of Flowering Locus T (FT) and Terminal Flower 1 (TFL1) in flowering of mango. **Acta Horticulturae**, v. 1183, p. 125–132, 2017.

LILLO, C.; LEA, U.S.; LEYDECKER, M.R.; 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.

LOPES, P. R. C.; HAJI, F. N. P.; MOREIRA, A. N.; MATTOS, M. A. A. **Normas técnicas e documentos de acompanhamento da Produção Integrada de Manga**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2003. 72p.

MAJEROWICZ, N.; FRANÇA, M.G.C.; PERES, L.E.P.; MÉDICI, L.O.; FIGUEIREDO, S.A. **Fisiologia Vegetal - Curso Prático**, Âmbito Cultural Edições Ltda., RJ, 2003.

MARSCHNER, H.; MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. London: Academic Press, 2012.

MARTUSCELLO, J.A.; MAJEROWICZ, N.; CUNHA, D.N.F.V. da; AMORIM, P. L. de; BRAZ, T.G.S. Características produtivas e fisiológicas de capim-elefante submetido à adubação nitrogenada. **Archivos de zootecnia**, v. 65, n. 252, p. 565-570, 2016.

MESQUITA, A.C.; MORAES, J.P.S. de; SOUZA, V. de; FERREIRA, K.M.; CAMPOS, L.D.A.; VIEIRA, D.A. Alteração bioquímica e enzimática em porta-enxertos de videira sob diferentes fontes de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 23, 2018.

- MOUCO, M.D.C. **Cultivo da mangueira**. Embrapa Semiárido-Sistema de Produção (INFOTECA-E), 2010.
- NASCIMENTO, V.M. do; FERNANDES, F.M.; PRADO, R. de M.; CORRÊA, L. de S.; NATALE, W. **Adubação da mangueira: alternativa para alta produção com qualidade**. Ilha Solteira, 2005, 118p.
- OLIVEIRA, M.A.J.; BOV, M.L.A.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciencia Rural**, v. 35, n. 3, p. 515-522, 2005.
- OLIVEIRA, L.J. de; SILVA, S.M. da; NETTO, A.P.C.; SILVA, S.M. da; SILVA, F.M. de S.M. Características agronômicas e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Campomanesia* sp. sob estresse hídrico. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 11, p. 43-53, 2011.
- ORDÓÑEZ, R.E.M. **Uso de ethephon em baixas concentrações na indução floral de mangueira (*Mangifera indica* L.) CV. Tommy Atkins**. 2011. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada da Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro- Ba.
- PRADO, C. H. B. A. **Aquisição e uso dos nutrientes minerais da solução do solo**. São Carlos: Tipographia Editora Expressa, 2013. 188 p.
- QUEIROZ, C.G.S.; RENA, A.B.; CORDEIRO, A.T.; ALVES, J.D. Ritmo diurno na atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.7, p.787-795, 1993.
- R CORE TEAM. 2018. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 27 de maio de 2019.
- RAMÍREZ, F.; DAVENPORT, T.L. Mango (*Mangifera indica* L.) flowering physiology. **Scientia Horticulturae**, v.126, p.65-72, 2010.
- RAJSZ, A.; WOJTUN, B.; MROZ, L.; ZOLNIERZ, L.; KEMPERS, A.J. Nitrate reductase activity in high mountain plants: a test across species, growth form and habitat type. **Press on behalf of the Institute of Botany**, 2018.
- RUIZ, J.M.; ROMERO, L. Nitrogen metabolism and yield response of cucumber (*Cucumis sativus* L cv Brunex) plants to phosphorus fertilisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 2069-2073, 2000.
- RUIZ, J.M.; ROMERO, L. Relationship between potassium fertilisation and nitrate assimilation in leaves and fruits of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. **Annals of Applied Biology**, v. 140, p. 241-245, 2002.
- SANTOS, A. de S. **Indução termoperiódica da niteato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (*Ananas comosus*)**. 2010.

Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, C.L.R. dos; CAZZETA, J.O.; SARAN, L.M.; SANCHES, A. Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 384-394, 2014.

SANTOS, S.A. dos. **Produção e qualidade de frutos da mangueira 'kent' com o uso de paclobutrazol (pbz) no submédio vale do são francisco**. 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Horticultura Irrigada) – Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Juazeiro, Bahia.

SILVA, D. J.; QUAGGIO, J. A.; PINTO, P. A. C.; PINTO, A. C. Q.; MAGALHÃES, A. F. J. Nutrição e adubação. In: GENU, P. J. C.; PINTO, C. A. Q. (Ed.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.191-222, 2002.

SILVA, G. J. N.; VILLELA, A. L. G. Indução floral da mangueira e princípios do controle fitossanitários. In: ROSANE, D. E. et al. (Ed) **Manga- Produção Integrada, Industrialização e Comercialização**. Viçosa: UFV, pg. 321- 338, 2004.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual review of plant biology**, v. 41, n. 1, p. 225-253, 1990.

SOUZA, M.A. de; MÉSQUITA, A.C.; SIMÕES, W.L.; FERREIRA, K.M.; ARAÚJO, E.F.J. Physiological and biochemical characterization of mango tree with paclobutrazol application via irrigation. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 4, p. 442-449, 2016.

SUDHA, R.; BALAMOCHAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K. Effect of foliar spray of nitrogenous chemicals on flowering, fruit set and yield in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Alphonso. **Journal of Horticultural Science**, v.7, n.2, p.190-193, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

URBAN, L.; LU, P.; THIBAUD, R. Inhibitory effect of flowering and early fruit growth on leaf photosynthesis in mango. **Tree Physiology**, v.24, p.387–399, 2004.

VIANA, E.M. **Interação de nitrogênio e potássio na nutrição, no teor de clorofila e na atividade da redutase de nitrato em plantas de trigo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia: solos e nutrição de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

WOLSTENHOLME, B.N.; WHILEY, A.W. Prospects for vegetative-reproductive growth manipulation in avocado trees. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, v. 13, p. 21-24, 1990.

WONGSRISAKULKAEW, Y.; BOONPRAKOB, U.; SETHPAKDEE, R.; JUNTAWONG, N. Effect of paclobutrazol concentrations and time of foliar application on flowering of 'namdokmai-sitong' mango. **International Journal of GEOMATE**, v. 12, n. 30, p. 41-45, 2017.

ANEXO

Tabela 1. Síntese da análise de variância para folhas de 1º e 2º fluxo vegetativo e raízes jovens (material vegetal) de mangueira cv. Palmer nas diferentes fenofases.

Fonte de variação	Valor 'F'		
	Material vegetal	DMS	CV (%)
Pré-poda	7,96*	0,02	14,67
Poda	0,49 ^{NS}	0,02	18,6
PBZ (12 DAA)	6,97*	0,03	19
PBZ (32 DAA)	12,22*	0,03	13,89
Maturação	16,26*	0,04	14,24
Pré-indução	38,22*	0,02	9,05
Indução floral	23,26*	0,03	11,48
Floração	9,60*	0,04	17,25
Frutificação	103,08*	0,01	6,19