

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -
AGRONOMIA**

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS
EM MUDAS DE *Anacardium othonianum* Rizz. SOB DOSES DE
NITROGÊNIO EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

**Autora: Layara Alexandre Bessa
Orientador: Fabiano Guimarães Silva**

**Rio Verde – GO
Julho – 2016**

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS
EM MUDAS DE *Anacardium othonianum* Rizz. SOB DOSES DE
NITROGÊNIO EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

**Autora: Layara Alexandre Bessa
Orientador: Fabiano Guimarães Silva**

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias.

**Rio Verde – GO
Julho – 2016**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS EM
MUDAS DE *Anacardium othonianum* Rizz. SOB DOSES DE
NITROGÊNIO EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

Autora: Layara Alexandre Bessa
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

TITULAÇÃO: Doutor(a) em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 18 de julho de 2016.

Prof^a. Dra. Marialva Alvarenga
Moreira
Avaliadora externa
UFV – Campus Viçosa

Prof^a. Dra. Clarice Aparecida
Megguer
Avaliadora externa
IF Goiano – Campus Morrinhos

Dra. Daniele Nogueira Dos
Reis Avaliadora interna
PNPD/IF Goiano – Campus
Rio Verde

Prof. Dr. Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho
Avaliador interno
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

A Deus, por possibilitar mais esta conquista em minha vida;

A Minha família, pelo apoio e incentivo;

Ao meu orientador, professor Dr. Fabiano Guimarães Silva, pela confiança e direcionamento;

A minha coorientadora, Dr^a. Marialva Alvarenga Moreira, pelo apoio científico, amizade e dedicação;

A aluna de iniciação científica, Cássia Lino Rodrigues, pelo auxílio na montagem e execução da pesquisa;

A FAPEG (Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Goiás), pela concessão da bolsa de doutorado;

Aos colegas do laboratório de cultura de tecidos vegetais desta instituição, pelo incentivo;

A equipe do laboratório de anatomia vegetal, pelo auxílio com as análises anatômicas.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Layara Alexandre Bessa, nascida em Morrinhos-Go, filha de Garcilene Alexandre e Pedro Divino Bessa é graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás (UEG) e possui especialização em Biotecnologia e Meio Ambiente pela mesma Universidade. Mestrado em Ciências Agrárias pelo Instituto Federal Goiano- Campus Rio Verde. Está presente no quadro de servidores técnicos administrativo do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, no cargo de assistente administrativo.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	iii
BIOGRAFIA DA AUTORA.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUÇÃO.....	1
Revisão de literatura.....	2
Nutrição mineral.....	3
Nitrogênio.....	4
Ultraestrutura e histoquímica.....	4
Metabolismo de nitrogênio.....	5
Referências bibliográfica.....	6
OBJETIVOS GERAIS.....	11
CAPÍTULO I- CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS	
FOLIARES DE MUDAS DE <i>Anacardium othonianum</i> RIZZ. SOB	12

DOSES DE NITROGÊNIO EM	
HIDROPONIA.....	
RESUMO.....	12
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	34
AGRADECIMENTOS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO NITROGENADA NO	
CRESCIMENTO, NA ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E NA	
ATIVIDADE ENZIMÁTICA de PLANTAS DE <i>Anacardium</i>	
<i>othonianum</i> RIZZ. EM SOLUÇÃO NUTRITIVA.....	48
RESUMO.....	49
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS.....	53
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES.....	71
AGRADECIMENTOS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
CONCLUSÃO GERAL.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I. Características morfoanatômicas foliares de mudas de *Anacardium othonianum* Rizz. sob doses de nitrogênio em hidroponia

Página

Tabela 1. Análises micromorfológicas do parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, mesófilo e alcalóides do tecido foliar de mudas de caju-de-árvore-de-cerrado, submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplântio (DAT).

23

Capítulo II. Influência da adubação nitrogenada no crescimento, na absorção de nutrientes e na atividade enzimática em plantas de *Anacardium othonianum* Rizz. em solução nutritiva

Tabela 1. Área foliar (cm²) da planta e da quarta folha de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio, em solução nutritiva.

55

Tabela 2. Atividade das enzimas Glutamina sintetase - GS (μ M de λ -

62

GH $\text{m}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína) e nitrato redutase - NR ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF) e teor de óxido nítrico - ON (nmol g^{-1} MF) em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L^{-1}) de nitrogênio em solução nutritiva.

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Capítulo I. Características morfoanatômicas foliares de mudas de *Anacardium othonianum* Rizz. sob doses de nitrogênio em hidroponia

- Figura 1.** Sintomas visuais em folhas de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplântio (DAT). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). 19
- Figura 2 -** Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplântio (DAT), corados com Azul de Toluidina. Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliçádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 µm; *: Sinuosidade da epiderme. 21
- Figura 3.** Densidade estomática (mm²) das superfícies adaxial e abaxial em folhas de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de 24

nitrogênio, em solução nutritiva, aos 90 dias após o transplântio.

Figura 4. Teores de clorofilas a, b, total e carotenoides ($\mu\text{g cm}^{-2}$) em mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva aos 90 dias após o transplântio.

26

Figura 5 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplântio (DAT), corados com reagente de Schiff (PAS) (visualização de polissacarídeos). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L^{-1} de N), 3 e 4 (2,5 mmol L^{-1} de N), 5 e 6 (5,0 mmol L^{-1} de N), 7 e 8 (7,5 mmol L^{-1} de N), 9 e 10 (10,0 mmol L^{-1} de N), 11 e 12 (12,5 mmol L^{-1} de N), 13 e 14 (15,0 mmol L^{-1} de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliçádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 μm .

28

Figura 6 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplântio (DAT), corados com cloreto férrico (visualização de compostos fenólicos). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L^{-1} de N), 3 e 4 (2,5 mmol L^{-1} de N), 5 e 6 (5,0 mmol L^{-1} de N), 7 e 8 (7,5 mmol L^{-1} de N), 9 e 10 (10,0 mmol L^{-1} de N), 11 e 12 (12,5 mmol L^{-1} de N), 13 e 14 (15,0 mmol L^{-1} de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliçádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 μm .

30

Figura 7 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplântio (DAT), marcados com o fluorocromo cloreto de alumínio (visualização de flavonoides). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L^{-1} de N), 3 e 4 (2,5 mmol L^{-1} de N), 5 e 6 (5,0 mmol L^{-1} de N), 7 e 8 (7,5 mmol L^{-1} de N), 9 e 10 (10,0 mmol L^{-1} de N), 11 e 12 (12,5 mmol L^{-1} de N), 13 e

32

14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Barra: 100 µm.

Figura 8 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplante (DAT), coradas com Reagente de Wagner (visualização de alcaloides). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 µm.

33

Capítulo II. Influência da adubação nitrogenada no crescimento, na absorção de nutrientes e na atividade enzimática em plantas de *Anacardium othonianum* Rizz. em solução nutritiva

Figura 1 - Número de folhas, número de nós e diâmetro do caule de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva.

55

Figura 2 - Massa da matéria seca da folha, caule, raiz e total de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva.

56

Figura 3 - Teores de macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva. a) Teor de N nas folhas, caule e raízes; b) Teor de P nas folhas, caule e raízes; c) Teor de K nas folhas, caule e raízes; d) Teor de Ca

58

nas folhas, caule e raízes, e) Teor de Mg nas folhas, caule e raízes; f) Teores de S nas folhas, caule e raízes.

Figura 4 - Teor de boro nas folhas, no caule e nas raízes em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva. 59

Figura 5 - Teores de macronutrientes (N, P, K e Ca) na quarta folha em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva. a) Teor de N; b) Teor de P; c) Teor de K; d) Teor de Ca. 61

Figura 6 - Teores de micronutrientes (Zn e Mn) na quarta folha em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva a) Teor de Cu; b) Teor de Zn. 62

Figura 7 - Representação da assimilação do nitrato em folhas de *Anacardium othonianum* Rizz. 71

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

AF	Área foliar
B	Boro
Ca	Cálcio
cm ²	Centímetros quadrados
CP	Célula plasmolizada
Cu	Cobre
DAS	Dias após a semeadura
DAT	Dias após o transplântio
DC	Diâmetro do caule
Ep ad	Epiderme adaxial
FAD	Dinucleotídeo flavina adenina
Fe	Ferro
g kg ⁻¹	Gramas por kilo
GS	Glutamina sintetase
HCl	Ácido clorídrico
K	Potássio
MF	Massa fresca
Mg	Magnésio
mg kg ⁻¹	Miligramas por kilo
mm ²	Milímetro quadrado
mmol L ⁻¹	Micromol por litro
Mn	Manganês

Mo	Molibdênio
MSC	Massa seca do caule
MSF	Massa seca das folhas
MSR	Massa seca da raiz
MST	Massa seca total
N	Nitrogênio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótideo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato
NADPH	Hidrogênio nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
NF	Número de folhas
NH ₄ ⁺	Amônio
nm	Nanometros
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NR	Nitrato redutase
ON	Óxido nítrico
P	Fósforo
pH	potencial de hidrogenio iônico
PP	Parênquima paliçádido
S	Enxofre
SP	Parênquima esponjoso
Zn	Zinco
µm	Micrometro
µm ²	Micrometro quadrado

RESUMO

Espécies frutíferas nativas do cerrado possuem mercado promissor que não consegue ser atendido pela falta de conhecimento científico, dentre essas frutíferas se destaca o caju-de-árvore-do-cerrado que se distingue das demais espécies da região central do Brasil, por seu porte arbóreo e por sua importância na economia regional. O nitrogênio é dos nutrientes mais requeridos pelas plantas. Assim, definir a dose deste nutriente é importante para garantir a produção de mudas de *A. othonianum* Rizz, evitar prejuízos econômicos com adubações nitrogenadas e minimizar a contaminação ambiental. O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar os efeitos de doses de nitrogênio, em solução nutritiva para a produção de mudas de *Anacardium othonianum* Rizz. O experimento foi conduzido em cultivo hidropônico no delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por sete doses de nitrogênio (0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹). As características avaliadas aos 30 e 90 DAT (dias após o transplante) foram: visuais, morfoanômicas, compostos histoquímicos e aos 120 DAT foram: produção de massa da matéria seca, teores de macro e micronutrientes e atividade das enzimas nitrato redutase (NR), glutamina sintetase (GS) e do mensageiro biológico de estresse, óxido nítrico (ON). A adubação nitrogenada em solução nutritiva influencia a produção de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado. A ausência de N afetou tanto a ultraestrutura quanto a frequência de compostos fenólicos, alcaloides e carboidratos. No entanto, na dose de 15,0 mmol L⁻¹ de N da solução foi observado indução no estímulo da frequência de alcaloides aos 90 DAT e redução da densidade estomática. A frequência de flavonoides não foi influenciada pela disponibilidade de N na solução nutritiva. O número máximo de folhas foi obtido na dose 10,7 mmol L⁻¹ de N. A dose de 2,5 mmol L⁻¹ estimulou a atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) enquanto a ausência de N aumentou a síntese do óxido nítrico em folhas de *A. othonianum* Rizz.

Palavras-chave: Nutrientes, frutífera do cerrado, hidroponia, ultraestrutura.

ABSTRACT

Native fruit of the Cerrado species have promising market that usually are not be met by the lack of scientific knowledge and among those fruit stands cashew-of-tree-do-cerrado distinguished from other species of central Brazil for its tree size and importance in the regional economy. Nitrogen is the nutrient most required by plants. So set the dose of this nutrient is important to ensure the production of *A. othonianum* Rizz seedlings, prevent economic losses from nitrogenous fertilizers and minimize environmental contamination. The objective of this study was to evaluate the effects of nitrogen in the nutrient solution for the production of *Anacardium othonianum* Rizz seedlings. The experiment was carried out in hydroponics conditions using a randomized block design with four replications. The treatments consisted of seven nitrogen levels (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 and 15.0 mmol L⁻¹). The characteristics evaluated at 30 and 90 DAT (days after transplanting) were: visual, morphoanatomic, histochemical compounds and 120 DAT were mass production of dry matter, macro and micronutrients and activity of nitrate reductase (NR) glutamine synthetase (GS) and biological stress messenger, nitric oxide (NO). Nitrogen fertilization in nutrient solution influences the production of cashew-tree-of-the-cerrado seedlings. The absence of N affected both the ultrastructure as the frequency of phenolic compounds, alkaloids and carbohydrates. However, at a dose of 15.0 mmol L⁻¹ of N was observed an stimulating alkaloids frequency at 90 DAT and decreased stomatal density. The frequency of flavonoid was not influenced by the availability of N in the nutrient solution. The maximum number of sheets was obtained at a dose of 10.7 mmol L⁻¹ of N. The dose of 2.5 mmol L⁻¹ stimulated the activity of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) while the absence of N increased nitric oxide synthesis in leaves of *A. othoniaum* Rizz.

Key words: Nutrients, fruit cerrado, hydroponics, ultrastructure.

INTRODUÇÃO

A vegetação do Cerrado possui características que a individualiza dos demais tipos de vegetação e tem sido sugerida a importância de estudos que permitam melhor entendimento dos seus mecanismos de adaptação (Assunção e Felfili, 2004). Dentro da grande diversidade deste bioma existem espécies frutíferas nativas com potencial de cultivos em sistemas tradicionais, dentre essas se destaca o *Anacardium othonianum* Rizzini, também conhecido como caju-de-árvore-do-cerrado, cajuzinho e cajuí.

O caju-de-árvore-do-cerrado é um dos cajueiros com grande importância econômica da região central do Brasil. Sua parte carnosa, que é pseudofruto é muito apreciada no Brasil para consumo *in natura* e também pode ser utilizada para produzir sorvetes, doces, sucos e bebidas (Vieira et al., 2006). Porém sua propagação é feita basicamente por sementes em condições controladas ou naturais, ocorrendo de forma irregular e lenta (Assis et al., 2011).

O *A. othonianum* Rizz. é uma frutífera típica e bem conhecida da região do cerrado e do planalto Central (Silva et al., 2013), e por isso os conhecimentos quanto ao seu aspecto nutricional, anatômicos e metabólicos fazem-se necessários para que se consiga produzir mudas de qualidade e em grande escala a fim de atender as demandas do mercado consumidor. Até o momento, sabe-se apenas que o N e o Ca são os nutrientes que mais se acumulam nestas plantas (Bessa et al., 2013).

A exposição da planta a estresses abióticos, como seca, salinidade, calor, radiação UV e disponibilidade nutricional podem afetar a produtividade da cultura. Além disso, essa exposição pode alterar a ultraestrutura e conseqüentemente a resposta da planta ao estresse (Wani et al., 2016).

Conhecimentos morfoanatômicos são essenciais quando se trata de exposição ao estresse abiótico, visto que a estrutura foliar pode sofrer alterações oriundas de

condições ambientais adversas. Em folhas de amoreira (*Morus alba*) tanto de plantas masculinas quanto femininas foram observadas alterações na ultraestrutura foliar quando expostas ao estresse abiótico provocado pela exposição em radiação UV-B (Chen et al., 2016). Em plantas de restingas (*Ipomoea pes-caprae* L. e *Canavalia rosea* DC) submetidas ao estresse nutricional provocado pelo excesso e ausência de ferro em cultivo hidropônico foi observado alterações morfológicas como formação de placas de ferro nas raízes, bem como alterações das ultraestruturas, comprometendo o desenvolvimento dessas plantas (Siqueira-Silva et al., 2012).

Os nutrientes representam fator relevante na organização estrutural do vegetal, contribuindo para composição organizacional de estruturas essenciais ao desenvolvimento da planta. Dentre os nutrientes, o nitrogênio tem papel relevante na fisiologia, estrutura e metabolismo vegetal. Ele está entre os nutrientes mais exigidos pelas plantas, seu metabolismo desempenha papel essencial nas plantas e mudanças na sua disponibilidade podem alterar a estrutura e a produtividade das culturas (Lea et al., 2006; Navarro-León et al., 2016).

As quantidades de nitrogênio a ser absorvido pelas plantas afetam todo o metabolismo das enzimas envolvidas nos processos de absorção e assimilação deste nutriente. Após a absorção de N na forma de nitrato, este pode ser armazenado no vacúolo ou reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase presente no citoplasma (Han et al., 2015) e é transportado para as folhas sendo feito o processo de assimilação que dará origem a aminoácidos, proteínas e compostos orgânicos necessários na produção final de biomassa (Navarro-León et al., 2016).

Outra enzima crucial no metabolismo do nitrogênio é a glutamina sintetase (GS) que é responsável pela catalização da síntese de glutamina fazendo a interação de glutamato e amônia (Silva et al., 2015). A glutamina é o produto primário da assimilação do nitrogênio a partir de todas as fontes inorgânicas deste nutriente.

Conhecer os mecanismos de eficiência do uso do nitrogênio em plantas de *A. othoniamun* Rizz é fundamental para estimar a quantidade correta de uso de fertilizantes nitrogenados evitando perdas econômicas e a degradação ambiental causada pelo excesso de adubações.

Revisão de Literatura

Espécies frutíferas como o *A. othonianum* Rizz são de grande importância econômica para a fruticultura regional. Porém a demanda para seu consumo vem crescendo pelas

suas qualidades organolépticas utilizadas na alimentação natural e também exploradas pelas indústrias alimentícias. Assim, a produção desses frutos ainda é oriunda, na sua grande parte, do extrativismo ou do semiextrativismo, demonstrando o pouco conhecimento científico sobre a produção em larga escala para estas espécies. O nitrogênio está entre os nutrientes mais requeridos pelas plantas e por isso, saber a concentração ideal deste nutriente através dos seus efeitos no crescimento, na estrutura e histoquímica foliar, na nutrição mineral e ainda no metabolismo do nitrogênio é essencial para a produção de mudas de *A. othoniaum* Rizz., visando dentre outras a sua utilização como matéria-prima, gerando alternativas sem, contudo levar ao esgotamento dos recursos naturais dificilmente renováveis.

Nutrição mineral

Os nutrientes minerais possuem funções essenciais e específicas no metabolismo vegetal podendo agir como constituintes da estrutura orgânica, ativadores de várias reações enzimáticas, carregadores de cargas osmorreguladoras (Epstein e Bloom, 2006).

As interações iônicas que afetam a disponibilidade, absorção e transporte de nutrientes, são altamente complexas, mesmo na ausência de salinidade e também de outros estresses (Souza et al., 2011).

O estresse nutricional em plantas sob estresse pode estar associado ao acúmulo excessivo de determinados íons e a redução na aquisição de outros, em virtude das alterações na disponibilidade de nutrientes de competição no processo de absorção e a inibição do transporte na planta (Blanco et al., 2008).

A presença de um nutriente essencial para as plantas não implica que o mesmo esteja disponível para as mesmas, sendo que seu efeito pode estar relacionado com sua concentração no solo, solubilidade, forma, capacidade em assimilar pela planta, temperatura, umidade e pH (Zambolim et al., 2005; Ferreira et al., 2012). É importante lembrar que a ausência ou o excesso de um determinado nutriente podem influenciar diretamente na absorção e no metabolismo da planta (Malavolta, 2006) afetando com isso sua produtividade. Bessa et al. (2012) observaram que as omissões de macronutrientes na solução nutritiva resultaram em alterações morfológicas, traduzidas como sintomas característicos de deficiência nutricional, diminuição no crescimento e produção de massa da matéria seca de mudas de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), quando comparado com o tratamento completo.

Nitrogênio

O nitrogênio é encontrado em muitos compostos orgânicos, incluindo todos os aminoácidos e ácidos nucleicos, visto que as plantas requerem grandes quantidades deste nutriente e sua disponibilidade geralmente é fator limitante na produtividade das plantas em ecossistemas naturais, incluindo espécies frutíferas (Epstein e Bloom, 2006). Este composto pode atravessar a membrana plasmática da célula do córtex da raiz e ser absorvido. Uma vez feita a absorção pelas plantas superiores no citoplasma da célula do córtex da raiz, o nitrato pode ser armazenado no vacúolo para uso posterior, transportado para dentro do xilema ou translocado para assimilação ou armazenamento (Wu et al., 2015).

Além do papel, de um elemento essencial, o nitrogênio na forma de nitrato também é utilizado como uma molécula de sinalização importante para regular a arquitetura da planta, estimular o crescimento, regular a abertura estomática, etc. O N na forma de nitrato é considerado um dos importantes reguladores ambientais no desenvolvimento vegetal (Wang et al., 2003; Wu et al., 2015).

Conhecer a eficiência do uso de nitrogênio em plantas é essencial para garantir o crescimento e a produção, sem, contudo, afetar os mecanismos de tolerância vegetal que possam gerar perdas na produção.

Grande parte dos fertilizantes nitrogenados aplicados nas plantas lixívia para águas subterrâneas ou volatiliza para atmosfera, visto que, aumentar a eficiência com que as plantas obtêm e absorvem este nutriente se faz de extrema importância para o conhecimento no aumento da produtividade vegetal.

Ultraestrutura e histoquímica foliar

Se um dos elementos químicos essenciais à planta está disponível em quantidades insuficientes ou em combinações químicas que são pobremente absorvidas, a deficiência deste elemento provocará desarranjos nos processos metabólicos da planta (Epstein e Bloom, 2006) promovendo mudanças nas características morfo-anatômicas que são de extrema importância, pois pode revelar várias características estruturais vegetais úteis como espessamento das paredes celulares, desenvolvimento de clorênquima, arranjo dos feixes vasculares, espessura da epiderme e cutícula, densidade estomática, organização de parênquimas clorofilianos, presença de tricomas e várias outras características estruturais (Ribeiro et al., 2012).

A anatomia de plântulas indica características que atribuem tolerância a diferentes condições do ambiente em plantas cultivadas, como tolerância a seca, radiação, qualidade e intensidade da radiação sobre as folhas (Batista et al., 2010; Ribeiro et al., 2012). As folhas são os órgãos vegetativos com maior variedade de características morfológicas e anatômicas e, de forma geral, expressam as condições ambientais de seu habitat (Somavilla et al., 2011).

Alterações na anatomia da folha constituem aspectos decisivos no conhecimento de espécies expostas a diferentes condições nutricionais e fisiológicas provocadas pelo ambiente, sendo a estrutura que mais se modifica em resposta a alguma alteração ambiental, constituindo o principal sítio de produção de fotoassimilados (Elias et al., 2003).

O estresse nutricional interfere nos processos de absorção, transporte e utilização de nutrientes pela planta (Souza et al., 2011) que frequentemente modificam os aspectos morfológicos e anatômicos do vegetal. Os estudos anatômicos que visam estudar os efeitos dos nutrientes na anatomia são importantes, visto que, a anatomia da planta pode influenciar na translocação de nutrientes (Rosolem e Leite, 2007). Dosagens de N que não estiverem disponíveis para as plantas nas faixas consideradas ideais, podem provocar algumas alterações quanto ao metabolismo, fisiologia e conseqüentemente na anatomia dos vegetais, promovendo alterações nas características morfo-anatômicas provenientes do estresse nutricional.

Condições adversas do ambiente, além de provocar alterações nas ultraestruturas foliares podem ainda estimular a síntese de compostos do metabolismo secundário, como alcaloides, compostos fenólicos e flavonoides. Em plantas de *Euphorbia characias* L. exposta nas condições adversas do mediterrâneo foi observado presença de alcaloides e compostos fenólicos, especialmente taninos condensados e acumulados dentro do vacúolo das células epidérmicas (Christodoulakis et al., 2015). Plantas de *Eleusine coracana* (L.) Gaertn tiveram alterações histoquímicas nos coleóptilos, nos níveis de lignina nas coleorhizas e no conteúdo de prolina em condições de estresse salino (Satish et al., 2016).

Metabolismo do nitrogênio

O nitrato, quando é absorvido pelas plantas, ou podem ser armazenados nos vacúolos ou reduzido pela enzima nitrato redutase no citoplasma (Xu et al., 2016). Essa enzima reduz o nitrato a nitrito usando NADH/NAD(P)/H/NADPH como doadores de

elétrons e possui três domínios de ligação de cofator, contendo um molibdenio, heme e FAD, respectivamente (Nemie-Feyissa et al., 2013).

A enzima GS é fundamental no metabolismo do nitrogênio, pois o produto de sua atividade, a glutamina é que inicia o processo assimilatório de N nas plantas a partir de todas as fontes inorgânicas deste macronutriente (de nitrato, absorção direta de amônio e de fixação de N, no caso das leguminosas). Além do seu papel fundamental na assimilação de N primário, a GS também está envolvida na reciclagem do N, sendo responsável pela assimilação do amônio liberado por vários processos metabólicos da planta, tais como o catabolismo e fotorrespiração. Esta enzima possui papéis múltiplos e existem em plantas, enzimas localizadas no citosol (GS1) e nos cloroplastos (GS2) (Silva et al., 2015).

O óxido nítrico (ON), uma molécula de sinalização gasoso fundamental, desempenha papéis importantes na modulação de várias funções fisiológicas e bioquímicas em plantas. Uma das vias mais conhecidas é a que envolve a participação da enzima do nitrato redutase, que além de catalisar a oxidação do nitrato em nitrito é responsável pela oxidação do nitrito em óxido nítrico (Crawford, 2006). A outra via envolve a ação do óxido nítrico sintase (ONS), em animais essa enzima promove a conversão da L-arginina em L-citrulina na presença de O₂ e NADPH, gerando ON, água e NADP⁺ como subprodutos. A atividade desta enzima também já tem sido detectada em plantas porque o inibidor da ONS foi relatado para bloquear a síntese de ON (Crawford, 2006). Em raízes de *Panax notoginseng* (Burk) a produção de ON induzida pela presença de Cd no solo foi significativamente reduzida pela aplicação de tungstato inibidor do nitrato redutase (kan et al., 2016).

Referências Bibliográficas

Assis, K.C.de.; Pereira, F.D.; Santos, S.C.; Silva, F.G.; Silva, A.F.da. Rendimento de explantes e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Anacardium othonianum* Rizz., oriundos de sementes armazenadas por diferentes períodos. Global Science and Technology, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2011.

Assunção, S.L.; Felfili, J.M. Fitossociologia de um fragmento de cerrado *sensu stricto* na APA do Paranoá, DF, Brasil. Acta Botânica Brasílica, Porto Alegre, v. 18, p. 903-909, 2004.

Batista, L.A.; Guimarães, R.J.; Pereira, F.J.; Carvalho, G.R.; Castro, E.M.de. Anatomia foliar e potencial hídrico na tolerância de cultivares de café ao estresse hídrico. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 3, p. 475-481, 2010.

Bessa, L. A.; Silva, F. G.; Moreira, M. A.; Teodora, J. P R.; Soares, F. A. L. Characterization of the effects of macronutrient deficiencies in mangabeira seedlings. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 4, 2012.

Blanco, F.F.; Folegatti, M.V.; Henriques Neto, D. Doses de N e K no tomateiro sob estresse salino: I Concentração de nutrientes do solo e na planta. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 12, n. 1, p. 26-33, 2008.

Chen, M.; Huang, Y.; Liu, G.; Qin, F.; Yang, S.; Xu, X. Effects of enhanced UV-B radiation on morphology, physiology, biomass, leaf anatomy and ultrastructure in male and female mulberry (*Morus alba*) saplings. *Environmental and Experimental Botany*, 2016 (artigo no prelo).

Christodoulakis, N. S.; Mamoucha, S.; Termentzi, A.; Fokialakis, N. Leaf structure and histochemistry of the hardy evergreen *Euphorbia characias* L. (Mediterranean spurge). *Flora*, v. 210, p. 13-18, 2015.

Crawford, N.M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal Experiment Botany*, n. 57, p. 471-478, 2006.

Elias, S.R.M.; Assis, R.M.; Seraphin, E.S.; Resende, M.H. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). *Brasilian Journal of Botany*, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2003.

Epstein, E.; Bloom, A.J. *Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas*. 2. ed. Londrina. Planta, 403p, 2006.

Ferreira, P.A.; Neves, W.dos.S.; Lopes, E.A.; Ferraz, S.; Freitas, L.G.de. Efeito da fertilização e da nutrição de plantas sobre doenças causadas por nematóides. *Revista trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 6, n. 2, p. 33, 2012.

Han, Y.L., Liao, Q., Yu, Y., Song, H.X., Liu, Q., Rong, X.M., Gu, J.D., Lepo, J.E., Guan, C.Y., Zhang, Z.H., Nitrate reutilization mechanisms in the tonoplast of two *Brassica napus* genotypes with different nitrogen use efficiency. *Acta Physiology*, p. 37-42, 2015.

Kan, Q.; Wu, W.; Yu, W.; Zhang, J.; Xu, J.; R, Z.; Chen, L.; Cui, X.; Chen, Q. Nitrate reductase-mediated NO production enhances Cd accumulation in *Panax notoginseng* roots by affecting root cell wall properties. *Journal of Plant Physiology*, v. 193, p. 64-70, 2016.

Lea, P.J.; Azevedo, R.A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology*, v. 149, n. 3, p. 243-247, 2006.

Navarro-León, E.; Barrameda-Medina, Y.; Lentini, M.; Esposito, S.; Ruiz, J. M.; Blasco, B. Comparative study of Zn deficiency in *L. sativa* and *B. oleracea* plants: NH₄ + assimilation and nitrogen derived protective compounds. *Plant Science*, v. 248, p. 8-16, 2016.

Nemie-Feyissa, D.; Królicka, A.; Førlund, N.; Hansen, M.; Heidari, B.; Lillo, C. Post-translational control of nitrate reductase activity responding to light and photosynthesis evolved already in the early vascular plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 170, p. 662-667, 2013.

Ribeiro, M.de.N.O.; Carvalho, S.P.de.; Pereira, F.P.; Castro, E.M. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 354-361, 2012.

Rosolem, C.A.; Leite, V.M. Coffee leaf and stem anatomy under boron deficiency. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 31, p. 477-483, 2007.

Satish, L.; Rathinapriya, P.; Rency, A.S.; Ceasar, S.A.; Prathibha, M.; Pandian, S.; Rameshkumar, R.; Ramesh, M. Effect of salinity stress on finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn): Histochemical and morphological analysis of coleoptile and coleorrhizae. *Flora*, v. 222, p. 111-120, 2016.

Silva, L.S.; Seabra, A.R.; Leitão, J.N.; Carvalho, H.G. Possible role of glutamine synthetase of the prokaryotic type (GSI-like) in nitrogen signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Science*, v. 240, p. 98-108, 2015.

Siqueira-Silva, A.I.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Oliva, M.A. Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 78, p. 265-275, 2012.

Somavilla, N.S.; Ribeiro, D.G. Análise comparativa de anatomia foliar de melastomataceae em ambiente de vereda e cerrado senso stricto. *Acta Botânica Brasílica*, v. 25, n. 4, p. 764-775, 2011.

Souza, A.E.C.; Silveira, J.A.G.; Gheyi, H.R.; Lima Neto, M.C.; Lacerda, C.F.de.; Soares, F.A.L. Trocas gasosas e conteúdo de carboidratos e compostos nitrogenados em pinhão-mansão irrigados com águas residuária e salina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 10, p. 1428-1435, 2012.

Souza, E.P.de.; Silva, I.de.F.; Ferreira, L.E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. *Revista Brasileira Agrociência*, v. 17, n. 2-4, p. 167-173, 2011.

Vieira, R.F.; Costa, T.S.A.; Silva, D.B.; Ferreira, F.R.; Sano, S.M. Frutas Nativas da Região Centro-Oeste. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 320 p. 2006.

Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., Crawford, N.M. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology*, v. 132, 556–567, 2003.

Wani, S.H.; Kumar, V.; Shriram, V.; Sah, S.k. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*. v. 4, n. 3, p. 162-176, 2016.

Wu, Y.; Zhang, W.; Liang, X.; Wang, Xianwen, Z.; Li, C.; Liu, L. Isolation and molecular characterization of nitrite reductase (RsNiR) gene under nitrate treatments in radish. *Scientia Horticulturae*, v. 193, p. 276-285, 2015.

Xu, H.; Zhao, X.; Guo, C.; Chen, L.; Li, K. Spinach 14-3-3 protein interacts with the plasma membrane H β -ATPase and nitrate reductase in response to excess nitrate stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 106, p. 187-197, 2016.

Zambolim, L.; Rodrigues, F.A.; Capucho, A.S. Resistência a doenças de plantas induzidas pela nutrição mineral. In: Venzon, M; Júnior, T. J. P & Pallini, A. (Ed.) *Controle alternativo de pragas e doenças*. Viçosa. EPAMIG/CTZM. p.185, 2005.

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar os efeitos de doses de nitrogênio, em solução nutritiva para a produção de mudas de *Anacardium othonianum* Rizz. Para atingir o objetivo geral foram realizados os experimentos descritos em dois capítulos:

Capítulo 1 - Objetivo específico: Caracterizar a anatomia quantitativa e qualitativa de mudas de *A. othonianum* Rizz., quando submetidas a diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva.

Capítulo 2 - Objetivo específico: Caracterizar o efeito de doses N sobre o crescimento, absorção de nutrientes e atividade enzimática para a produção de mudas *Anacardium othonianum* Rizz em solução nutritiva.

CAPÍTULO I

Características morfoanatômicas foliares de mudas de *Anacardium othonianum* Rizz. sob doses de nitrogênio em hidroponia

Resumo

O nitrogênio é um nutriente essencial que geralmente é exigido em grandes quantidades pelas plantas. Conhecer a dose de nitrogênio que estimule as rotas de metabolismo primário e secundário é importante para o manejo da adubação nitrogenada nas plantas em geral, sendo que esta informação ainda encontra-se indisponível para mudas de cajude-árvore-do-cerrado. Baseando-se na hipótese de que a disponibilidade de nitrogênio para mudas de *A. othonianum* Rizz. pode afetar os mecanismos fisiológicos e adaptativos de suas folhas, foi instalado um experimento para caracterizar a anatomia quantitativa e qualitativa de tecido foliar, em plantas dessa espécie submetidas à doses de 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹ de N em solução nutritiva. Concluiu-se que as características visuais e morfoanatômicas foliares foram amplamente influenciadas pelas doses de nitrogênio, sendo a menor densidade estomática observada nas plantas expostas à dose de 15 mmol L⁻¹ de N. A frequência de flavonoides no entanto, não foi influenciada pela disponibilidade de N na solução, porém, a ausência de nitrogênio afetou diretamente a síntese de clorofila total, carotenoides, o acúmulo de compostos fenólicos, carboidratos e alcaloides presentes nas folhas de mudas de cajude-árvore-do-cerrado mantidas em solução nutritiva.

Palavras-chave: anatomia foliar, solução nutritiva, histoquímica

Introdução

O Cerrado brasileiro se destaca pela flora biodiversa, em que várias frutíferas com alto potencial para exploração agrícola e econômica se desenvolvem. Características como alta radiação solar e condições climáticas favoráveis colocam este

bioma em evidência, por culminarem em alta produtividade. Além disso, o interesse mundial por frutos e espécies produzidas no cerrado brasileiro tem aumentado, em decorrência do alto valor nutricional e do sabor característico (Souza et al., 2015). Neste contexto, o caju-de-árvore-do-cerrado vem se destacando entre as espécies nativas das regiões centrais do Brasil. O pseudo-fruto maduro (pendúnculo carnudo) tem uma cor que varia entre o vermelho e amarelo (Sousa et al., 2011), podendo ser consumido *in natura*, na fabricação de doces, sucos e picolés (Vieira et al., 2006). A árvore, possui propriedades típicas do gênero *Anacardium*, permitindo sua utilização na medicina popular, bem como na recuperação de áreas degradadas.

Apesar das condições de clima e relevo dentro dos domínios do Bioma Cerrado serem as ideias para o cultivo desta frutífera, a falta de conhecimento quanto às exigências nutricionais para *Anacardium othoninaum* Rizz. ainda são fatores limitantes, que afetam a produção e o cultivo da espécie. Até o momento, sabe-se apenas que os nutrientes nitrogênio e cálcio são os que mais se acumulam durante o estágio inicial de desenvolvimento desta espécie (Bessa et al., 2013). O nitrogênio é um elemento essencial, exigido em grandes quantidades pelas plantas. Sua aplicação auxilia no crescimento, principalmente da parte aérea, mas se administrado em excesso pode afetar a absorção dos outros nutrientes. Em plantas de *Manihot esculenta*, a fertilização com N aumentou a distribuição de Zn nos caules e folhas e a alocação de Cu nos caules. (Magolbo et al., 2015). Portanto, doses elevadas deste nutriente, além de influenciarem diretamente no desenvolvimento vegetal, podem impactar o meio ambiente (Liu et al., 2015). Além disso, altas doses desencadeiam vários outros estresses que podem atingir a anatomia foliar e consequentemente os metabolismos primário e secundário da planta. Por outro lado, plantas submetidas a deficiência de N podem desenvolver senescência foliar provocada pela peroxidação dos lipídeos e pela perda da pigmentação, relacionada com a produção de clorofila. Em plantas de *Nicotiana tabaccum* sob deficiência de N houve redução na biomassa e aumentos nos níveis dos danos oxidativos (Rubio-Wilhelmi et al., 2011).

Qualquer forma de estresse, biótico ou abiótico, pode alterar as propriedades da planta e do fruto. Características morfológicas, arranjos de feixes vasculares, textura ou morfologia dos frutos podem ser alterados através da exposição ao estresse. Exemplos como o excesso de radiação ultravioleta, bem como a disponibilidade hídrica podem promover alterações na produção de biomassa e nos mecanismos fotoprotetores das plantas, incluindo alterações morfológicas em folhas de *Laurus nobilis* (Bernal et al.,

2015). A absorção e acumulação de metais em altas concentrações também podem afetar os mecanismos fisiológicos, modificando as ultraestruturas vegetais (Siqueira-Silva et al., 2011). Os efeitos do estresse nutricional gerados pela absorção e acúmulo de nutrientes, como o N são percebidos nas folhas, sendo que a anatomia foliar e a histoquímica, ferramentas que podem auxiliar no entendimento das alterações que as diferentes concentrações deste nutriente podem provocar na planta mesmo antes que estes possam se tornar visíveis. Alguns estudos mostram que a anatomia vegetal e avaliações na ultraestrutura possibilitam analisar as condições de cultivo e ainda as respostas das plantas nas diferenças ambientais (Fernandes et al., 2014; Jezler et al., 2015), inclusive os relacionados ao estresse nutricional, refletidos em mudanças estruturais na arquitetura interna das plantas.

Avaliações histoquímicas podem auxiliar no levantamento e visualização dos compostos que a planta produz quando é exposta a determinada condição ambiental ou nutricional. A disponibilidade de nutrientes como o nitrogênio está inteiramente relacionada com a produção de metabólitos nitrogenados, que geralmente são mais sintetizados em altas concentrações deste na solução. Porém, em alguns casos, o aumento da biomassa da planta e a quantidade de nitrogênio que chega a ser incorporada nos tecidos podem levar a diminuição nos metabólitos nitrogenados (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Essa produção de compostos do metabolismo secundário relacionados com a absorção de N depende de cada espécie e da tolerância que cada uma delas possui em relação aos fatores causadores do estresse.

A absorção de nitrogênio também influencia diretamente na biossíntese de compostos essenciais ao processo fotossintético como a síntese de clorofila (por exemplo, Silva Júnior et al., 2013) que é constituída por átomos de nutrientes como N e Mg. A absorção de nitrogênio e a síntese de clorofila são altamente relacionados e alguns trabalhos demonstram esta associação, que inclusive, permite a diagnose do estado nutricional das plantas através da quantificação dos pigmentos fotossintéticos (por exemplo Yuan et al., 2016). Nas folhas, além destes pigmentos, estão presentes os estômatos que são essenciais nas trocas gasosas. Cada estômato apresenta duas células-guarda que regulam a abertura e o fechamento destes (Gupta e Bhatnagar, 2015). Exposição a condições de estresse ambiental pode levar a alterações na quantidade estômatos presentes nas folhas.

Conhecer o impacto que as diferentes doses de nitrogênio podem causar no crescimento vegetal e estrutura foliar, bem como as possíveis adaptações

morfoanatômicas e fisiológicas a essas condições, melhora a eficiência do uso deste nutriente, evitando perdas econômicas e danos ambientais. Além disso, estudos avaliando os efeitos das concentrações de nitrogênio são essenciais para recomendações técnicas que visem economias satisfatórias (Prando et al., 2013). Para isto, avaliações estruturais, histoquímicas e fisiológicas são indispensáveis por fornecer visões sobre os efeitos, produção e alterações que o estresse nutricional pode provocar nas plantas. Neste contexto, este trabalho buscou caracterizar a anatomia quantitativa e qualitativa de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado, quando submetidas a diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva.

Material e Métodos

Frutos de *A. othonianum* Rizz. foram amostrados em quatro pontos da fazenda Gameleira, município de Montes Claros – GO, com as coordenadas geográficas: 16.09436° S -51.21617°O a 385 m de altitude; 16.10698° S - 51.27012° O a 412 m; 16.11594° S - 51.27737° O a 404 m; 16.13295° S - 51.29675° O a 595 m; 16.13266° S – 51.30228° O a 609 m. Posteriormente, estes frutos foram levados para o laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde – GO, e foi realizada a despolpa manual para obtenção das sementes. A umidade de superfície das sementes foi retirada por secagem com toalhas de papel a temperatura ambiente. As sementes foram tratadas com fungicida Vitavax-Thiram [Ingrediente ativo (carboxina + thiram): 200 + 200 g L⁻¹], utilizando 300 mL de fungicida por 100 Kg de sementes e secaram em contato direto com gel de sílica em tabuleiros de plástico (35 x 30 x 8 cm) até atingir um nível de 13% de umidade. Posteriormente as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em BOD a 10°C.

A semeadura foi realizada em bandejas plásticas com dimensões de 48 x 34 x 8,5 cm, tendo areia como substrato e após 30 dias da semeadura, quando as plantas estavam com 4-5 folhas definidas, estas foram transplantadas para vasos com capacidade de 8 litros nutritiva com ½ força iônica de cada tratamento da solução de Hoagland e Arnon (1950), e permaneceram por 30 dias para adaptação. Após este período, as plantas foram submetidas aos tratamentos constituídos por sete doses de N. A solução nutritiva de cada tratamento foi mantida sob aeração constante e o volume completado diariamente com água deionizada. Mediu-se a condutividade elétrica e o pH diariamente. O pH foi ajustado a $5,5 \pm 0,5$ com adição de HCl ou NaOH, quando

necessário e a troca da solução nutritiva foi realizada mediante o critério de 30% de depleção do valor inicial da condutividade elétrica.

Características anatômicas

Aos 30 e 90 DAT (Dias Após o Transplântio) foram coletadas amostras de 0,5 cm² do terço médio das folhas de uma planta por vaso utilizando navalhas descartáveis. As amostras do material vegetal foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) por 24 horas, desidratadas em série etílica crescente, pré-infiltradas e infiltradas em historesina (Historesin-Leica), de acordo com as recomendações do fabricante. O material foi seccionado transversalmente com 5µm de espessura, em micrótomo rotativo (Modelo 1508R). Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina – coloração poliacromática, a 0,05% em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8 para análise estrutural e micromorfométricas (O'Brien et al., 1964).

As características mensuradas foram: espessura das epidermes adaxial e abaxial, dos parênquimas paliádico e esponjoso, do mesofilo e da área corada com compostos fenólicos e de alcaloides, obtidas com o auxílio de *software* de tratamento de imagens (ImageJ gratuito de código aberto - <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) (Ferreira e Rasband 2010). As avaliações de compostos fenólicos e alcaloides foram feitas através de análises estruturais e da estimativa da área corada. Já para polissacarídeos foram feitas apenas análises estruturais, pois o reagente de Schiff (usado na coloração) reage com polissacarídeos estruturais e de reserva, não sendo possível fazer a análise da área corada.

Histoquímica foliar

Em luz visível

Foram utilizados os cortes do material incluídos em historesina, como descrito acima para características anatômicas. As análises histoquímicas foram realizadas conforme Johansen (1940), seguindo o protocolo de coloração de O'Brien e McCully (1981). As secções obtidas em micrótomo foram submetidas a coloração de cloreto férrico para determinação dos compostos fenólicos, reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos neutros e reagente de Wagner para alcaloides (Furr e Mahlber, 1981).

Em luz Ultra Violeta

Para análise histoquímica em microscopia de Fluorescência foram coletadas amostras frescas da lâmina foliar na região mediana de folhas totalmente expandidas, seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação Ltda, Belo Horizonte, Brasil). Os cortes obtidos foram submetidos ao fluorocromo Cloreto de alumínio para flavonoides (Figueredo et al., 2007). Todas as imagens anatômicas e histoquímicas foram obtidas utilizando Microscópio Olympus modelo BX61, com câmera de vídeo digital Olympus modelo DP-72, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

Densidade Estomática

Foi realizada aos 90 DAT, através do método de impressão de epiderme, onde utilizou-se fragmentos da região do limbo foliar pressionados sobre lâmina de vidro contendo uma gota de adesivo instantâneo universal (éster de cianoacrílico) por aproximadamente 3 minutos, para espalhar e secar o adesivo permitindo a separação entre lâmina e folha, registrando-se a impressão da epiderme.

A análise micromorfométrica de densidade estomática das superfícies abaxial e adaxial das folhas ocorreu com o auxílio do *software* Anati Quanti (Aguiar et al., 2007).

Pigmentos fotossintéticos

Aos 90 DAT três discos de massa da matéria fresca conhecida, com 5 mm de diâmetro foram retirados das folhas, incubados com solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com CaCO_3 (Kuki et al., 2005) e armazenados em tubos vedados e envolvidos com papel alumínio pelo período de 24 horas sob temperatura de 65°C. Posteriormente, a absorvância do extrato obtido foi determinada por espectrofotometria, através dos seguintes comprimentos de onda: 664, 649 e 480 nm. Esses comprimentos de ondas, bem como as equações utilizadas no cálculo das concentrações de clorofila a, b, total e carotenoides foram baseados no trabalho de Wellburn (1997).

Características visuais 30 e 90 DAT

Aos 30 e 90 DAT foram descritas as características visuais dos tecidos foliares das mudas de *A. othonianum* Rizz submetidas às diferentes concentrações de nitrogênio, por meio de anotações e registros fotográficos obtidos com Câmera Digital Sony Cyber-shot Dsc-s 730 7.2 Megapixels para cada tratamento.

Análise estatística

Os tratamentos foram constituídos por sete doses de N (0 - 2,5 - 5,0 - 7,5 - 10,0 - 12,5 - 15,0 mmol L⁻¹) e o experimento implantado sob delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições por tratamento, sendo cada unidade experimental composta de dois vasos, com duas plantas por vaso.

Os resultados para as características anatômicas foram obtidos a partir de 10 observações por repetição e posteriormente submetidos a análise de variância e teste de comparação de médias (teste Tukey - a 5% de probabilidade). Os dados de clorofila e densidade estomática foram avaliados por método de regressão, sendo os modelos escolhidos baseados no coeficientes de determinação, na significância dos coeficientes de regressão e utilizando o teste t ao nível de até 5% de probabilidade. Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Sisvar® (Ferreira, 2010).

RESULTADOS

Características visuais

Os sintomas visuais em folhas de mudas de *A. othonianum* Rizz., submetidas a diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva estão apresentados na Figura 1.

Houve diferença visual das folhas nas duas épocas de avaliações (30 e 90 DAT). Aos 30 DAT foi possível observar apenas clorose, principalmente nas plantas submetidas à dose de 0 mmol L⁻¹ de N (Figura 1 - 1). Na dose de 15 mmol L⁻¹ de N as folhas mais velhas apresentavam tom verde pálido (Figura 1 - 13). Na dose de 2,5 mmol L⁻¹ de N foi observado o início de alguns pontos cloróticos que mais tarde, aos 90 DAT, estenderam-se por toda a folha (Figura 1 - 3 e 4). Os danos cloróticos foram percebidos inicialmente nas folhas mais velhas da planta. As demais soluções com diferentes doses de N não induziram cloroses visíveis nas folhas aos 30 DAT.

Aos 90 DAT a clorose se generalizou por toda folha principalmente nas plantas submetidas às doses de 0; 2,5 e 15 mmol L⁻¹ de N, em solução nutritiva (Figura 1 - 2, 4 e 14).

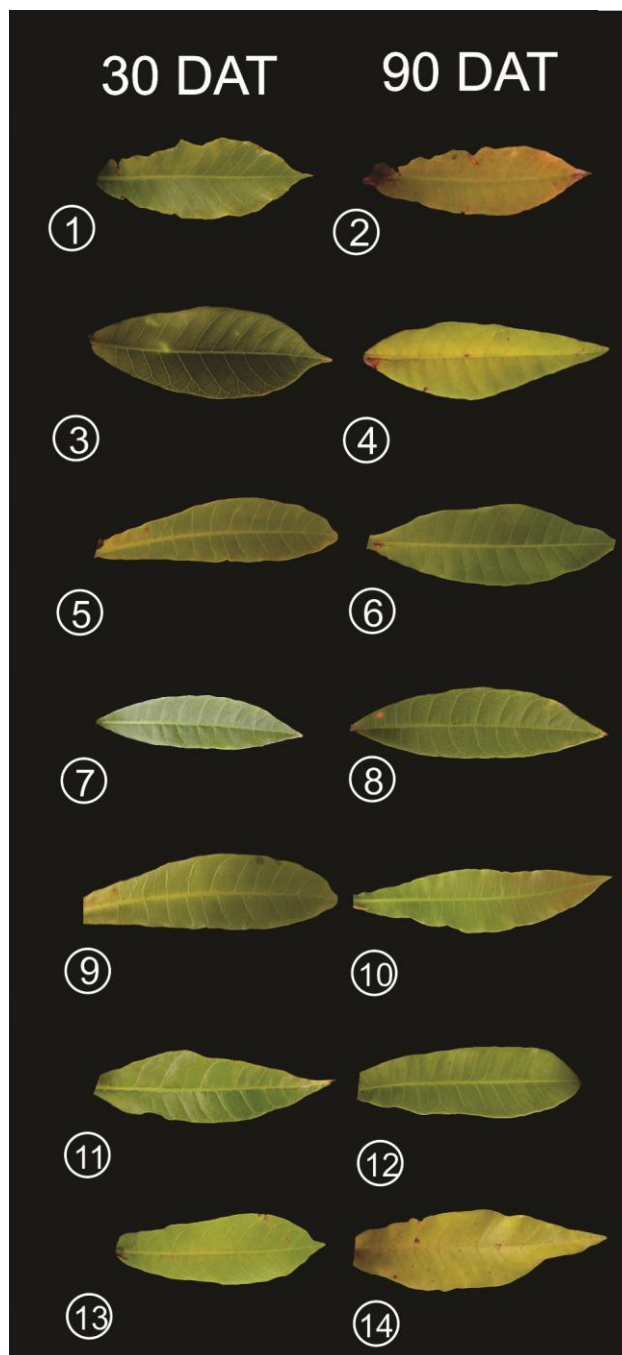


Figura 1. Sintomas visuais em folhas de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplante (DAT). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L^{-1} de N), 3 e 4 ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de N), 5 e 6 ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de N), 7 e 8 ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de N), 9 e 10 ($10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de N), 11 e 12 ($12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de N), 13 e 14 ($15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de N).

Características anatômicas

Cortes transversais de folhas de mudas de *A. othonianum* Rizz., aos 30 e 90 dias após o transplante (DAT) são mostrados na Figura 1, e as respectivas análises

micromorfométricas estão na tabela 1. Foram observadas diferenças entre as doses de nitrogênio avaliadas, bem como entre as duas épocas de avaliações. A epiderme adaxial mostrou alterações de acordo com as doses de N aplicadas em solução nutritiva (Figura 2). Sinuosidades nas epidermes adaxial e abaxial foram vistas aos 90 DAT com as doses 0 e 15 mmol L⁻¹ de N (Figura 2 - 2 e 14). Células plasmolisadas também foram encontradas aos 30 DAT nas doses 0; 2,5; 5 e 15 mmol L⁻¹ de N e aos 90 DAT 0; 2,5 e 15 mmol L⁻¹ de N (Figura 2 - 1, 3, 5 e 13; Figura 2 - 2, 4 e 14).

O mesofilo foi afetado pelas diferentes doses de nitrogênio na solução nutritiva. Aos 30 DAT, a dose de nitrogênio que mais influenciou no desenvolvimento do parênquima paliçádico, esponjoso e do mesofilo foi 15 mmol L⁻¹ de N com 35,58; 56,91 e 94,69 µm, respectivamente (Tabela 1) (Figura 2 - 13). O parênquima paliçádico da dose 15 mmol L⁻¹ de N, nesta mesma época se mostrou bastante desorganizado e desestruturado, e aos 90 DAT foi observado aumento volumétrico neste parênquima e as células se mostraram mais cilíndricas (Figura 2 - 14). Aos 90 DAT as doses de N em solução nutritiva que menos contribuíram para o desenvolvimento do parênquima paliçádico foram 0; 5 e 10 mmol L⁻¹ de N, com 55,52; 50,97 e 51,74 µm (Tabela 1) (Figura 2 - 2, 6 e 14), para o parênquima esponjoso foram as doses de 5; 10 e 15 mmol L⁻¹ de N com os respectivos valores de 73,71, 63,62 e 71,88 µm (Tabela 1) (Figura 2 - 6, 10 e 14) e para o mesofilo foram as doses 5; 10 e 15 mmol L⁻¹ de N com, 132,65; 117,54 e 132,6545 µm, respectivamente (Tabela 1) (Figura 2 - 6, 10 e 14). Apesar do menor comprimento encontrado no mesofilo para a dose de 10 mmol L⁻¹ de N aos 90 DAT, as células se mostraram organizadas e cilíndricas, assim como ocorreu nas doses de 7,5 e 12,5 mmol L⁻¹ de N (Figura 2 - 8, 10 e 12).

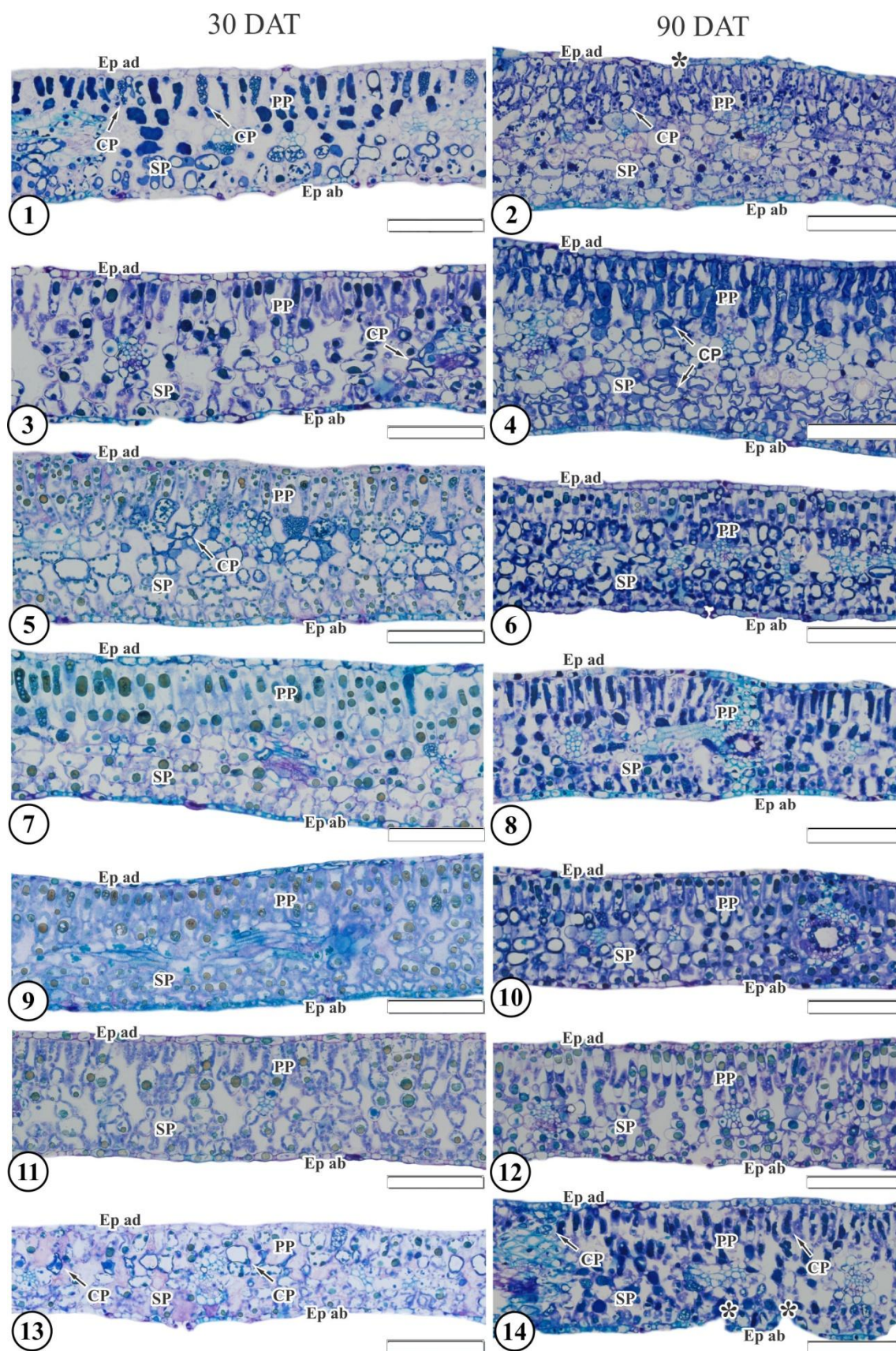


Figura 2 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após

o transplântio (DAT), corados com Azul de Toluidina. Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliçádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 µm; *: Sinuosidade da epiderme.

Tabela 1 - Análises micromorfométricas do parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, mesofilo e alcaloides do tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz., submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplântio (DAT).

Concentração de N (mmol L ⁻¹)	Época	Epiderme Adaxial (µm)	Epiderme Abaxial (µm)	Mesofilo (µm)	Parênquima Paliçádico (µm)	Parênquima Esponjoso (µm)	Compostos Fenólicos (µm ²)	Alcaloide (µm ²)
0,0	30 DAT	8,47 Aa	6,98 Aa	123,57 Ca	48,54 Ba	71,53 Cb	3059,56 ABa	1417,27 Ba
	90 DAT	9,34 Aa	7,67 Aa	137,91 ABCa	55,52 BCDA	86,69 ABa	3315,25 Ca	765,40 Bb
2,5	30 DAT	8,30 Aa	6,94 Aa	143,91 ABa	48,45 Bb	88,27 ABa	3147,89 ABa	3401,60 Aa
	90 DAT	8,72 Aa	7,17 ABa	162,36 Aa	61,22 Aba	103,11 Aa	3778,98 Ca	2380,83 ABb
5,0	30 DAT	8,41 Aa	6,75 Aa	157,04 Aa	55,17 Aba	98,61 Aa	4869,43 ABa	2074,47 Aba
	90 DAT	8,54 Aa	6,58 ABa	124,59 Cb	50,97 Da	73,71 BCB	4676,43 Ba	2260,20 ABa
7,5	30 DAT	7,32 Ab	6,97 Aa	149,04 Aa	58,68 Aa	89,89 Aa	5034,18 Aa	3375,82 Aa
	90 DAT	8,49 Aa	6,64 ABa	153,51 ABa	60,49 ABCa	89,60 ABa	4157,73 Aa	2838,46 ABa
10,0	30 DAT	7,71 Aa	5,72 Aa	130,15 BCa	51,18 ABa	75,60 BCa	130,15 BCa	3593,55 Aa
	90 DAT	7,74 Aa	6,10 Ba	117,54 Cb	51,74 CDA	63,62 Cb	6680,99 Aa	4045,07 ABa
12,5	30 DAT	7,35 Ab	6,34 Aa	118,90 Cb	47,86 Bb	70,57 Cb	3723,89 ABb	2603,99 ABa
	90 DAT	9,00 Aa	7,24 ABa	151,10 ABa	66,92 Aa	88,69 ABa	6423,70 Aa	3663,02 ABa
15,0	30 DAT	7,58 Aa	6,18 Aa	94,69 Db	35,58 Cb	56,91 Db	2894,21 Bb	1070,95 Bb
	90 DAT	8,09 Aa	6,78 ABa	132,65 BCa	62,65 Aba	71,88 BCa	5935,11 Aa	4489,38 Aa
C.V	30 DAT	24,72	23,72	12,20	20,75	17,20	19,74	29,60
	90 DAT	22,93	20,80	18,82	16,20	25,54	4,81	27,18

Letras maiúsculas comparam as concentrações de N aos 30 e aos 90 DAT (dias após o transplântio). Letras maiúsculas comparam entre as duas épocas de avaliação.

Densidade estomática

A densidade estomática em folhas de *A. othonianum* Rizz. foi influenciada pelas diferentes doses de N em solução nutritiva, aos 90 DAT (Figura 3). Tanto na superfície abaxial quanto na adaxial as doses de 11 e 10,4 mmol L⁻¹ de N foram as que mais estimularam a densidade estomática no tecido foliar, com valores médios de 597,02 e 174,64 mm² respectivamente. A dose de 15 mmol L⁻¹ de N mostrou a menor densidade estomática com 386,69 mm² na superfície abaxial e 108,03 mm² na adaxial.

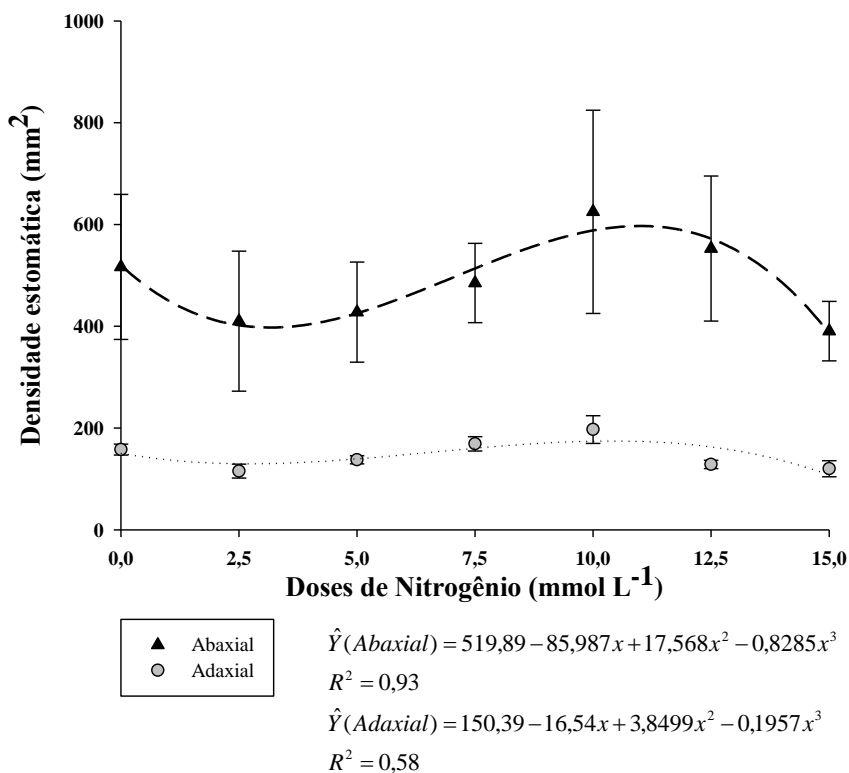


Figura 3. Densidade estomática (mm²) das superfícies adaxial e abaxial em folhas de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva aos 90 dias após o transplantio.

Pigmentos fotossintéticos

Foi encontrada diferença entre os teores de clorofila a, b e total em relação às doses de nitrogênio fornecidas em solução nutritiva para as plantas de *A. othonianum* Rizz. (Figura 4). Para a clorofila total (clorofila a + clorofila b) o valor máximo estimado foi na dose de 11,4 mmol L⁻¹ de N, atingindo a concentração de 53,95 µg cm⁻² deste pigmento. Os menores valores de clorofila total (11,99 µg cm⁻²) foram observados nas plantas submetidas à solução nutritiva ausente de nitrogênio (0 mmol L⁻¹ de N). No entanto, as plantas submetidas a maior dose de N avaliada apresentaram média de 49,78 µg cm⁻² para a síntese de clorofila total.

Para os teores de carotenoides as maiores sínteses estimadas foram de 10,30 µg cm⁻² encontradas na dose de 11,3 (mmol L⁻¹) de N e as menores sínteses estimadas foram de 5,37 µg cm⁻² presente nas plantas submetidas à solução nutritiva com 0,0 mmol L⁻¹ de N.

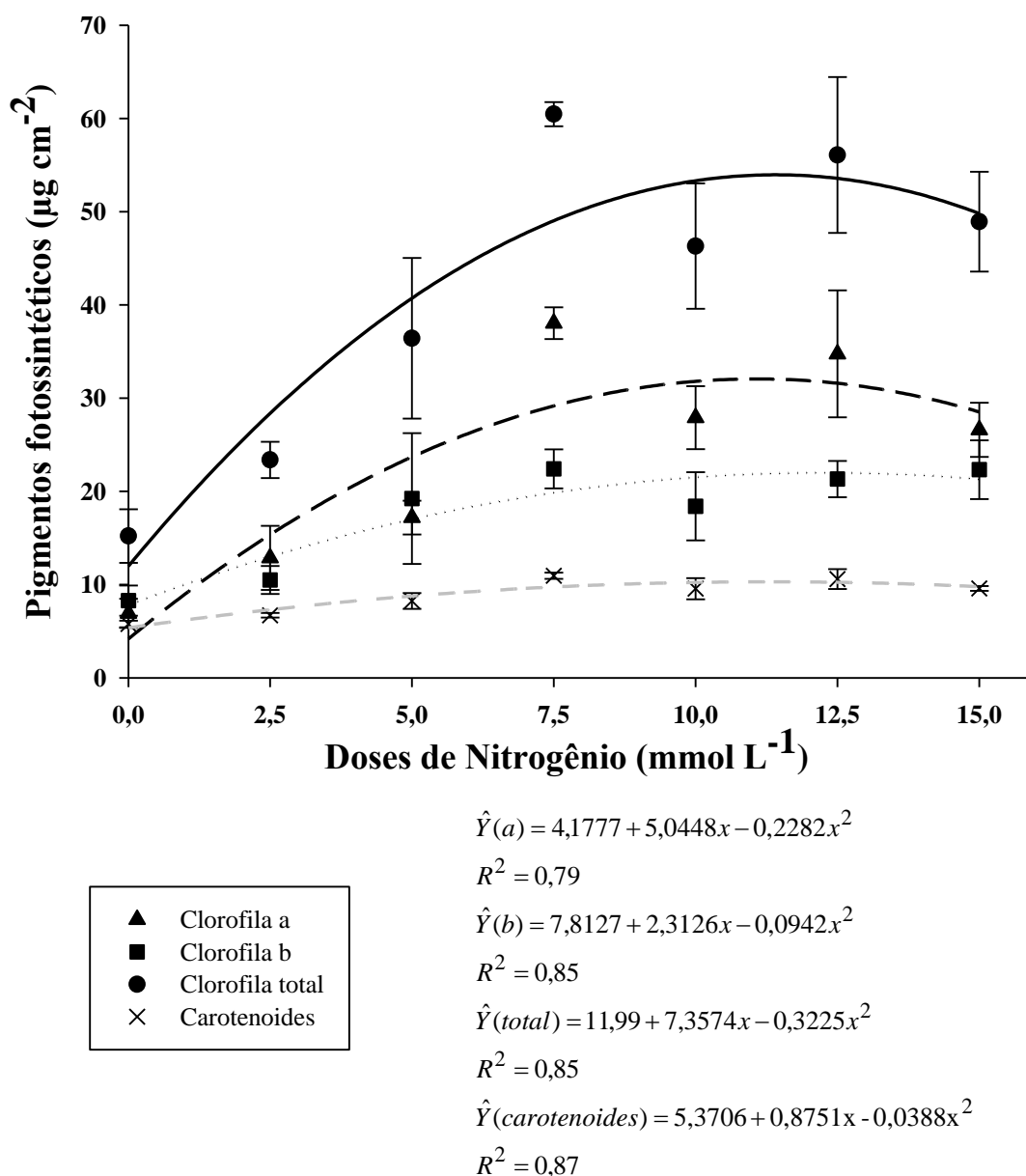


Figura 4. Teores de clorofilas a, b, total e carotenoides ($\mu\text{g cm}^{-2}$) em mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva aos 90 dias após o transplântio.

Histoquímica foliar

Foram realizados testes histoquímicos em folhas de *A. othonianum* Rizz. para detecção de polissacarídeos, compostos fenólicos totais, flavonoides e alcaloides. Todos os testes foram positivos na presença dos respectivos corantes, conforme mostra as

figuras 5, 6, 7 e 8. O teste para polissacarídeos foi positivo, como pode ser observado em todo mesofilo (Figura 5). Em todos os tratamentos ocorreram elevações dos acúmulos de carboidratos aos 90 DAT, quando comparados aos 30 DAT, com exceção da dose de 2,5 mmol L⁻¹ de N, e foi possível observar diminuição na frequência destes compostos aos 90 DAT, em relação aos 30 DAT (Figura 5 - 3 e 4). Tanto aos 30 DAT quanto aos 90 DAT, as maiores frequências destes compostos ocorreram nas doses de 7,5; 10 e 12,5 mmol L⁻¹ de N (Figura 5 - 7, 8, 9, 10, 11 e 12) e as menores frequências foram encontradas na dose 0 mmol L⁻¹ de N para as duas épocas de avaliações (30 e 90 DAT) (Figura 5 - 1 e 2).

O teste realizado para detectar compostos fenólicos evidenciou essa substância no mesofilo (Tabela 1) (Figura 6). Aos 30 DAT a dose de 7,5 mmol L⁻¹ de N foi a que mais possibilitou maior média para a frequência desses compostos (5034,18 μm²) (Figura 6 - 7), enquanto na dose de 15 mmol L⁻¹ de N foi detectada a menor presença (2894,21 μm²) (Figura 6 - 13). Aos 90 DAT, as plantas submetidas à dose de 10 mmol L⁻¹ de N foram as que apresentaram maior média para o acúmulo de compostos fenólicos (6680,99 μm²) (Tabela 1) (Figura 6 - 10) e o menor acúmulo foi encontrado nas doses de 0 (3315,25 μm²) e 2,5 mmol L⁻¹ (3778,98 μm²) de N (Tabela 1) (Figura 6 - 2 e 4). Também foi observado aumento no acúmulo de compostos fenólicos, quando comparadas as duas épocas de amostragem (30 e 90 DAT) nas doses de 10; 12,5 e 15 mmol L⁻¹ de N, sendo os valores aumentados de 3350,44; 3723,89 e 2894,21 para 6680,99; 6423,70 e 5935,11 μm² de área, respectivamente (Figura 6 -9, 10, 11, 12, 13 e 14), respectivamente.

Flavonoides foram detectados na epiderme das folhas, marcados com o fluorocromo Cloreto de Alumínio (Figura 7). Em todos os tratamentos foi detectada a presença de flavonoides, porém, não houve diferença na produção deste metabólito entre as doses de N nas diferentes épocas de crescimento avaliadas (Figura 7).

Com relação aos alcaloides, o teste para detecção identificou a presença destes nas folhas de *A. othonianum* Rizz. (Figura 8). Aos 30 DAT a maior área para alcaloide foi observada na dose de 10 mmol L⁻¹ de N, com 3593,55 μm² (Tabela 1) (Figura 8 - 9) e a menor área na dose de 15 mmol L⁻¹ de N, com 1070,95 μm² (Tabela 1) (Figura 8 - 13). Porém, aos 90 DAT a área corada para alcaloide na dose de 15 mmol L⁻¹ de N aumentou para 4489,38 μm², sendo encontrada nesta dose a maior produção de alcaloides em plantas de caju-de-árvore-do-cerrado (Tabela 1) (Figura 8 - 14). Nesta

mesma época a menor área corada com alcaloide ocorreu na dose 0 mmol L⁻¹ de N (Figura 8 - 2).

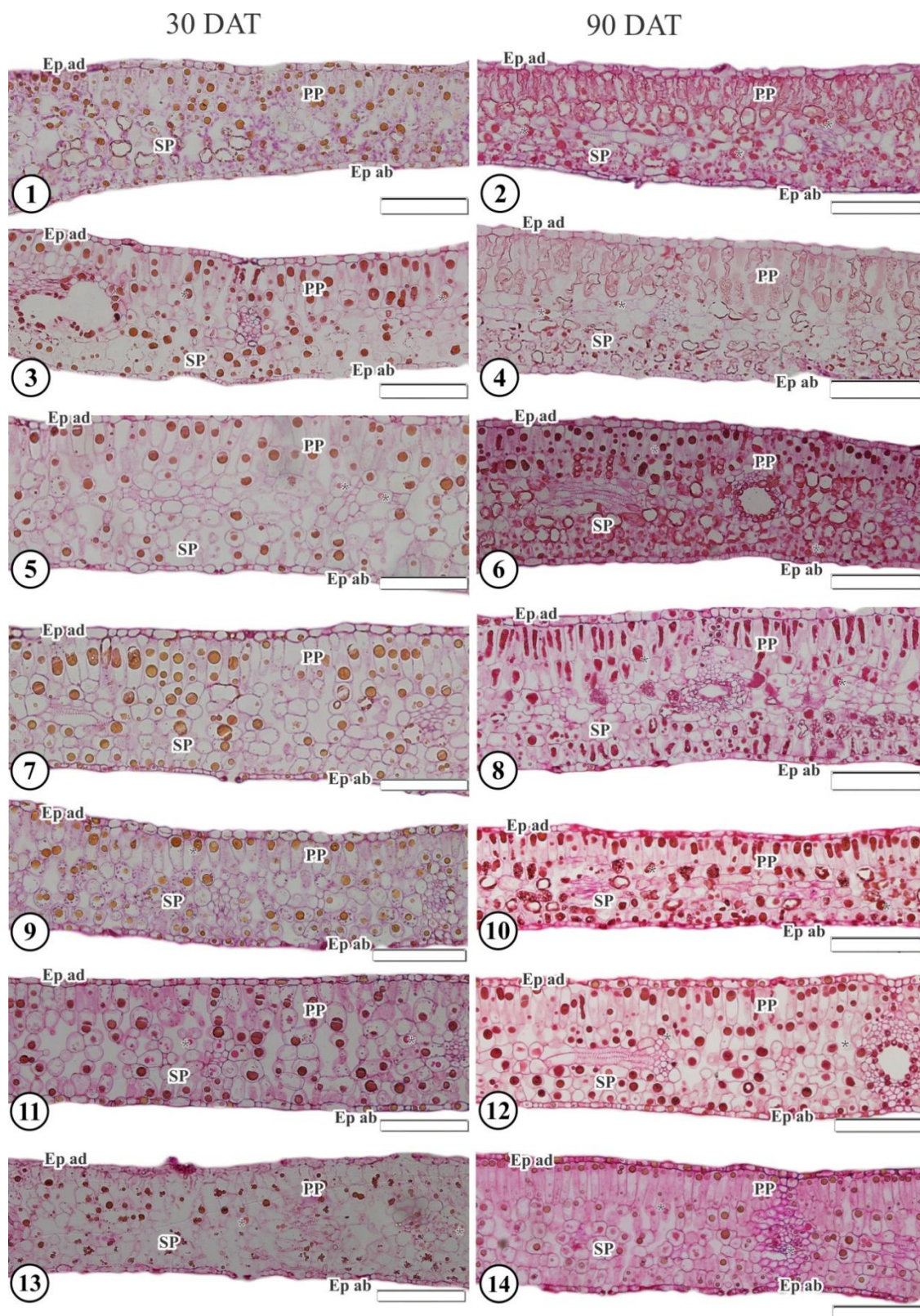


Figura 5 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz.

submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplante (DAT), corados com reagente de Schiff (PAS) (visualização de polissacarídeos). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliçádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 µm.

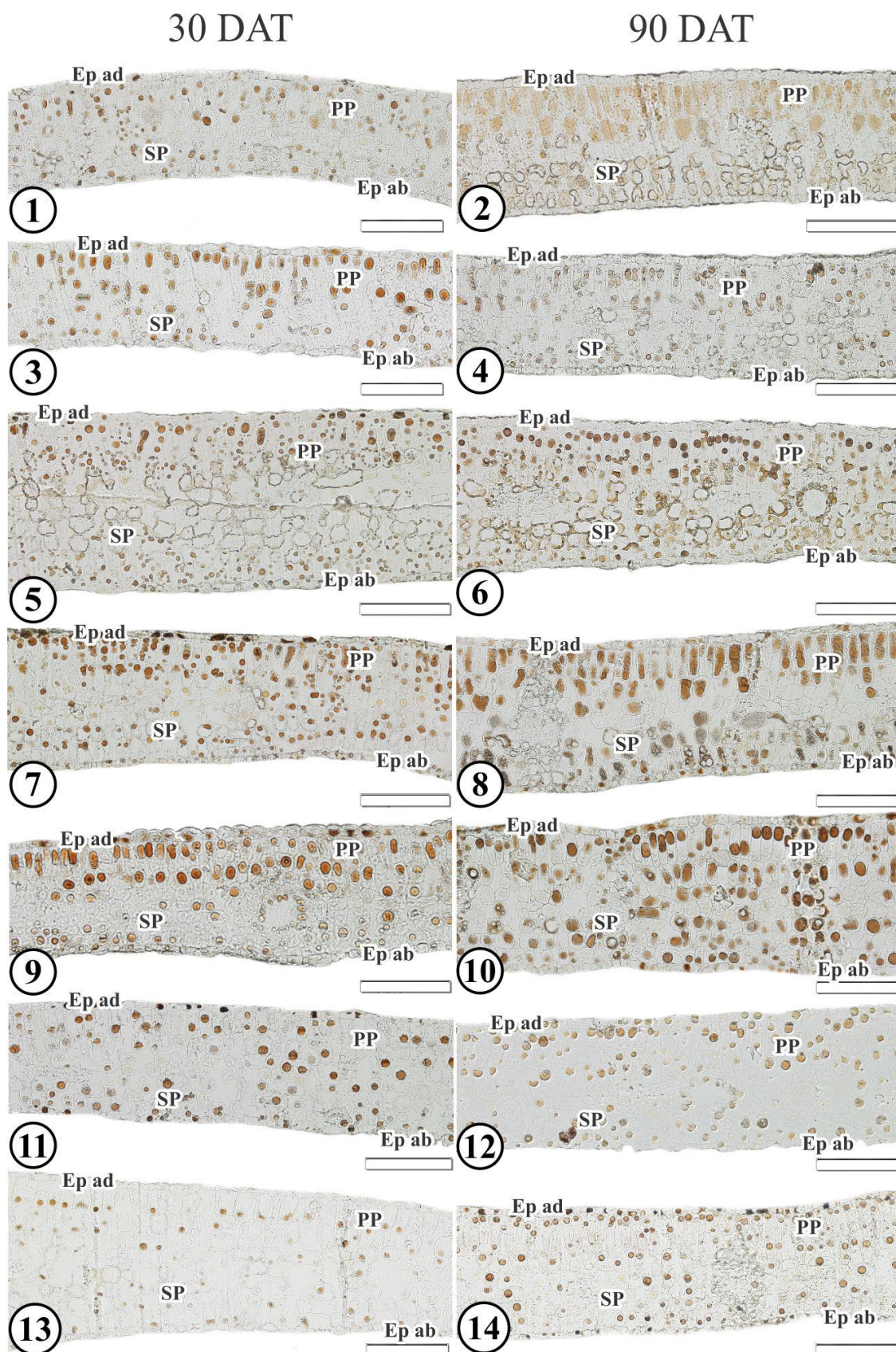


Figura 6 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplante (DAT), corados com cloreto férrico (visualização de compostos

fenólicos). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliçádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 µm.

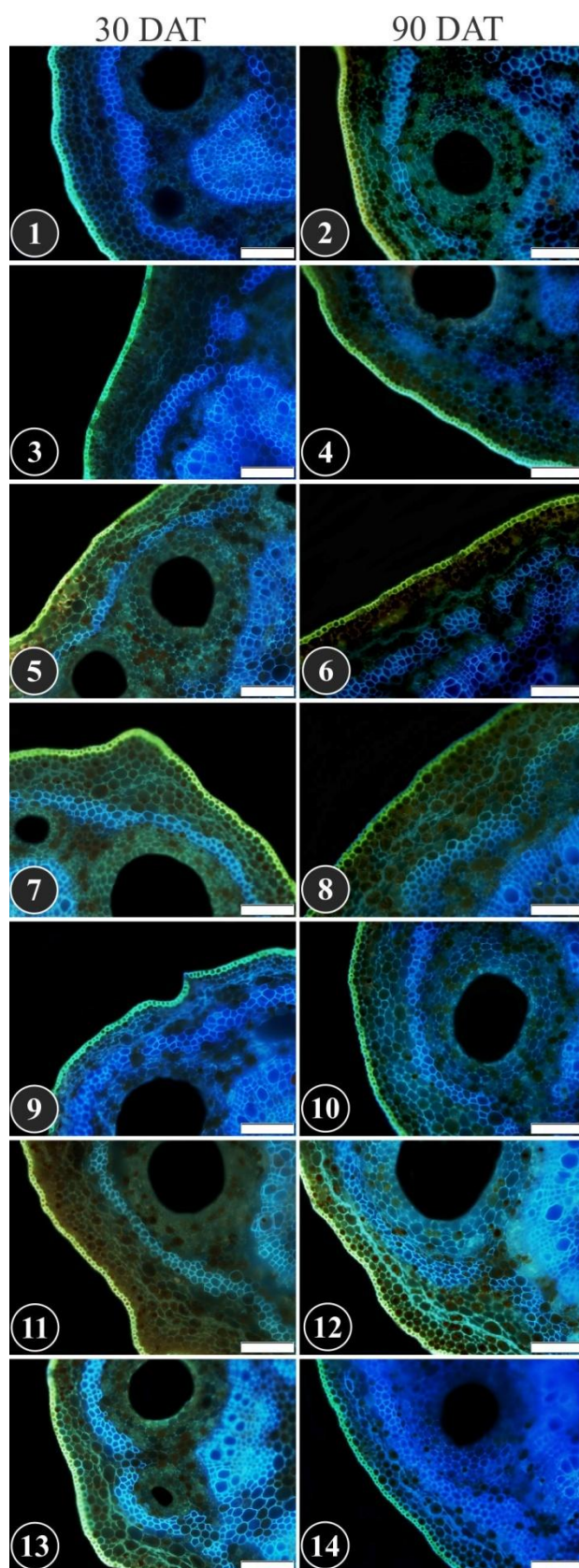


Figura 7 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após

o transplântio (DAT), marcados com o fluorocromo cloreto de alumínio (visualização de flavonoides). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Barra: 100 μ m.

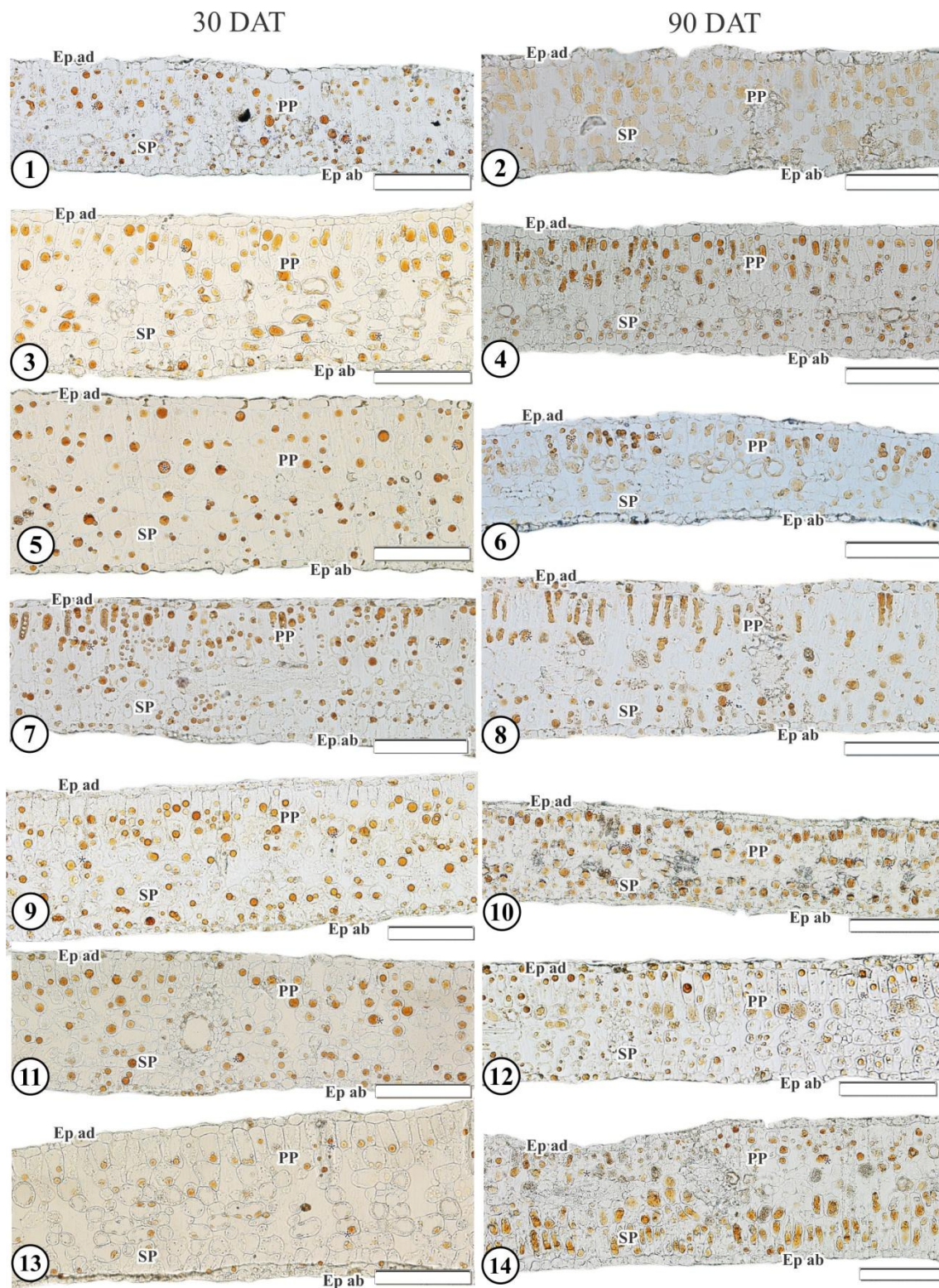


Figura 8 - Cortes transversais de tecido foliar de mudas de *A. othonianum* Rizz. submetidas a diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, aos 30 e 90 dias após o transplante (DAT), coradas com Reagente de Wagner (visualização de alcaloides). Tratamentos: 1 e 2 (0 mmol L⁻¹ de N), 3 e 4 (2,5 mmol L⁻¹ de N), 5 e 6 (5,0 mmol L⁻¹ de N), 7 e 8 (7,5 mmol L⁻¹ de N), 9 e 10 (10,0 mmol L⁻¹ de N), 11 e 12 (12,5 mmol L⁻¹ de N), 13 e 14 (15,0 mmol L⁻¹ de N). Ep. ad.: Epiderme adaxial; Ep. ab.: Epiderme abaxial; SP: Parênquima esponjoso; PP: Parênquima paliçádico; CP: Célula plasmolisada. Barra: 100 µm.

DISCUSSÃO

Características visuais

Quando a planta se encontra exposta a algum tipo de estresse, os efeitos destes são percebidos inicialmente nas folhas, porém os mesmos se tornam visíveis depois de afetarem várias rotas do metabolismo da planta, que interferem no funcionamento do aparato fotossintético e conseqüentemente no crescimento. Muitos trabalhos vêm mostrando os efeitos das doses de N sobre o aspecto visual da folha (Haim et al., 2012; Romualdo et al., 2014). Neste estudo foi possível observar sintomas visuais provocados pelas diferentes doses de N disponibilizadas para as mudas de *A. othonianum* Rizz., em solução nutritiva. Foram identificadas cloroses generalizadas especialmente aos 90 DAT nas plantas submetidas às doses de 0; 2,5 e 15 mmol L⁻¹ de N. Isso pode ter ocorrido porque tanto a baixa disponibilidade deste nutriente, como o seu fornecimento em excesso podem afetar o crescimento da planta, podendo ser observados visualmente. Em geral o fornecimento de nitrogênio em baixas doses provoca amarelimento generalizado com clorose intensa começando nas folhas mais velhas. Em plantas de *Hancornia speciosa* Gomes sob deficiência de N foi observado clorose generalizada inicialmente nas folhas mais velhas (Bessa et al., 2012).

Características anatômicas

Morfologia e estrutura interna das folhas estão diretamente relacionadas à interação planta/ambiente e as diferentes capacidades adaptativas que garantem a sobrevivência da espécie (Perrone et al., 2015). A ausência ou o excesso de nutrientes são fatores abióticos que interferem na adaptação vegetal, e, de forma geral, o nitrogênio é o nutriente quantitativamente mais requerido para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Liu et al., 2015). A anatomia foliar bem estruturada, com

formação organizada do mesófilo, muitas vezes oferece vantagens adaptativas ao ambiente nativo de uma espécie. Um ambiente ideal pode proporcionar melhores rendimentos na fotossíntese, proporcionando ampla oferta de luz, água e nutrientes, auxiliando na produção de cultivares que melhor se adaptem as condições adversas do ambiente (Tholen et al., 2012).

Para o *A. othonianum* Rizz, as doses de 0 e de 15 mmol L⁻¹ de N em solução nutritiva afetaram a estrutura dos parênquimas paliçádicos e esponjoso, corroborando com a evidência de que o estresse nutricional provocado por diferentes doses de N afetam a estrutura foliar. É comum que em condições estressantes estas estruturas sejam alteradas, afetando os metabolismos primário e secundário da planta. Lima et al. (2013) também observaram que o estresse térmico alterou toda estrutura foliar de plantas de *Coffea arabica* L. Em *Malus prunifolia* e *Malus hupehensis* o estresse abiótico por déficit hídrico, promoveu modificações nas ultraestruturas incluindo mecanismos de adaptação para proteger os componentes celulares e reparação dos danos provocados por espécies reativas de oxigênio (Wang et al., 2012).

Densidade estomática

As diferentes doses de nitrogênio disponível para as plantas de *A. othonianum* Rizz. em solução nutritiva influenciaram na formação de unidades estomáticas. Sob as doses de 11 e 10,4 mmol L⁻¹ de N foram detectadas as maiores densidades estomáticas abaxiais e adaxiais. Sabe-se que a densidade e a dinâmica de abertura e fechamento de estômatos são mecanismos que podem limitar o desenvolvimento vegetal, provocando queda na absorção de CO₂ e na interceptação de luz (Medeiros et al., 2011). Além disso, sob a dose de 15 mmol L⁻¹ de N, em solução nutritiva foi observado redução na densidade estomática das mudas de *A. othonianum* Rizz. Este resultado é compatível com tendência à diminuição no aparato fotossintético estimulada pelas altas concentrações de nitrogênio na solução, que preconiza situação de estresse. Porém, em plantas de *Solanum tuberosum* L. cultivadas em solo, foi observada tendência de aumento da densidade estomática na medida em que as concentrações de nitrogênio fornecidas se tornaram maiores (Yan et al., 2012). Diversos tipos de estresses afetam a estrutura e a quantidade de estômatos nas plantas, pois são estruturas altamente sensíveis às variações ambientais. Yang et al. (2015) observaram que o estresse salino em *Lagenaria siceraria* Standl. usadas como porta enxertos em mudas de *Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf., promoveram limitações estomáticas. Contudo, outros tipos de

estresse abióticos, assim como o estresse hídrico, também podem modificar a abertura e a densidade estomática (Yan et al., 2012).

Pigmentos fotossintéticos

A concentração máxima de clorofila total em *A. othonianum* Rizz. ocorreu nas mudas submetidas à dose estimada de 11,4 mmol L⁻¹ de N, indicando que ocorreu estímulo do aparelho fotossintético e conseqüentemente do metabolismo primário. Isto acontece pela relação direta entre a concentração de nitrogênio absorvido pelas plantas e clorofila, pois este nutriente participa com quatro átomos na molécula estrutural da clorofila (Coelho et al., 2012). A partir da dose de 11,4 mmol L⁻¹ de N foi observada diminuição na produção destes pigmentos fotossintéticos. Tal comportamento pode ser explicado pela proposição de que o N absorvido em excesso seja acumulado como nitrato, não se associando a molécula da clorofila. Esse efeito conhecido como consumo de luxo do nutriente pode conferir aspecto amarelado à planta (Dwyer et al., 1995; Haim et al., 2012). Em condições de alta disponibilidade de nitrogênio, parte do N absorvido pode não ser convertido em compostos orgânicos, afetando a produtividade o que caracteriza o chamado “consumo de luxo” (Coelho et al., 2012). Além disso, as altas concentrações de N podem induzir respostas de defesa na planta, limitando a síntese de pigmentos e conseqüentemente a fotossíntese. O teor de N foliar vai resultar em alterações no complexo sistema de membranas dos tilacoides que consistem basicamente de clorofila e na fixação de carbono através da enzima ribulose 1,5-bisfosfato (Schlemmer et al., 2013). O efeito da concentração de N foliar é dependente da espécie, visto que algumas plantas toleram altas concentrações deste nutriente, sem que estas acarretem danos no aparelho fotossintético e indução de espécies reativas de oxigênio (EROs). Contudo, Hurtado et al. (2010) verificaram um comportamento linear para os teores de clorofila em relação as doses de nitrogênio em plantas de *Zea mays*. Theago et al. (2014) também verificaram correlação positiva entre o teor de clorofila e as doses de nitrogênio em plantas de trigo. Em *Cucumis sativus* foi observado que a exposição a baixas concentrações de nitrogênio alterou suas rotas metabólicas através do acúmulo de ABA que promoveu a biossíntese de clorofila e inibiu a degradação deste pigmento nas plantas avaliadas (Oka et al., 2012).

Os maiores teores de carotenoides encontrados neste trabalho ocorreram na dose estimada de 11,3 µg cm⁻², sendo que tal fato pode estar relacionado com o alto estímulo

de síntese dos pigmentos fotossintéticos, tanto para carotenoides quanto clorofila total a partir desta concentração de N em plantas de *A. othonianum* Rizz. Carotenoides são pigmentos envolvidos no processo fotossintético essencial ao fornecimento da pigmentação vegetal e seu metabolismo é amplamente influenciado por estímulos ambientais (Cao et al., 2017). Em mudas de *Hymenaea courbaril* L. submetidas à salinidade em sistema hidropônico foi verificado incremento de até 28% para os teores de carotenoides (Nascimento et al., 2015).

A relação dos pigmentos fotossintéticos com o nitrogênio é discutida na literatura e muitos trabalhos mostram a influência deste nutriente em algumas respostas fisiológicas de fotossíntese e até mesmo de fluorescência (Wei et al., 2015). Outros fazem referências quanto ao sensoriamento remoto para estimativa de nitrogênio feita a partir da pigmentação das folhas (Kalacska et al., 2015).

Histoquímica foliar

Plantas expostas a diferentes situações de estresse, estão susceptíveis a desequilíbrios metabólicos que podem resultar na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüentemente em respostas do metabolismo secundário (Ahmad et al., 2016). O fornecimento inadequado de nutrientes e outros fatores bióticos e abióticos resultam em distúrbios do metabolismo, sendo que a deficiência, ou mesmo o excesso de nutrientes podem promover maior ou menor produção de metabólitos secundários.

O metabolismo dos carboidratos é importante por fornecer energia (ATP) e agentes redutores tais como NADPH e NADP, fundamentais no processo de assimilação do nitrato/amônio e conseqüentemente formação dos aminoácidos, enzimas e proteínas. Assim, o acúmulo de carboidratos pela planta está inteiramente associado à absorção e assimilação do nitrogênio. O carbono e o nitrogênio são elementos essenciais no metabolismo e a razão C/N é essencial para regulação do crescimento vegetal (Reyes et al., 2016). Conhecer a relação do nitrogênio com o metabolismo de carboidratos pode auxiliar no entendimento da eficiência do uso deste elemento pelas plantas, na diminuição das perdas ambientais e no aumento da produtividade (Xu et al., 2012). Neste trabalho, o fornecimento em solução nutritiva de nitrogênio a partir das doses de 7,5; 10,0; 12,5 mmol L⁻¹ proporcionaram maiores presenças de carboidratos aos 90 DAT. Isso pode ser explicado pela possível ativação da rota de metabolismo primário, estimulada pelo fornecimento de N nessas doses, que culminou no acúmulo de

carboidratos, via processo fotossintético. As doses de 0 e de 15 mmol L⁻¹ de N, em solução nutritiva não induziram o acúmulo de polissacarídeos em nenhuma das épocas avaliadas, ou seja provavelmente sob estas doses de nitrogênio, as plantas de *A. othonianum* não tiveram suas rotas fotossintéticas super ativadas.

Compostos fenólicos são metabólitos secundários cuja síntese está inteiramente relacionada a fatores abióticos como a umidade, temperatura e disponibilidade nutricional. Ou seja, isso se deve principalmente a associações do mecanismo de interação planta - meio ambiente e conseqüentemente algum tipo de estresse provocado pelo meio (Sousa et al., 2013). Um dos tipos mais comuns de estresse é o causado pela indisponibilidade, ou mesmo a disponibilidade em excesso de nutrientes em plantas. Neste trabalho foram observadas baixas frequências de compostos fenólicos na ausência de N. Este fato pode estar relacionado a ativação de outras rotas metabólicas mediante a ausência do fornecimento de N, em folhas de *A. othonianum* Rizz, visto que outras doses intermediárias estimularam o acúmulo deste composto. Compostos fenólicos atuam na interação da planta com o ambiente tanto em relações simbióticas (polinização e fixação de nitrogênio) bem como na defesa a restrições bióticas e abióticas. Sua acumulação está relacionada com os fatores genéticos, o tipo de órgão avaliado, seu estágio de crescimento e aos fatores ambientais como a disponibilidade de nitrogênio. (Larbat et al., 2014). Reis et al. (2014) observaram, em plantas de *A. occidentale* durante os estádios iniciais de desenvolvimento, o acúmulo de lipídios totais e compostos fenólicos, entre eles taninos e lignina, em diferentes tecidos da folha, enquanto Shukri e Alan (2010) observaram em frutos dessa espécie, um total de quinze compostos fenólicos, com concentrações diferentes para a variedade amarela (12,1 mg/g de peso fresco) e vermelha (6,4 mg/g de peso fresco).

Outro metabólito secundário, pertencente ao grupo dos compostos fenólicos, e que estão presentes nas plantas, principalmente como glicosídeos, são os flavonoides (Hernández et al., 2009). A presença destes metabólitos nas folhas é normalmente relacionada com respostas às altas irradiâncias solares, por sua atuação como mecanismo de defesa física e blindagem contra radiação UV-B (Majer et al., 2014). Dependendo da espécie, a concentração de N nas folhas pode inclusive ser estimada através de alguns equipamentos portáteis, pela existência de correlação negativa deste nutriente com os teores de flavonóis e a correlação positiva com os teores de clorofila (Coelho et al., 2012). Porém em plantas de *A. othonianum* Rizz., diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva não interferiram quanto à presença de flavonoides nas

folhas. Em outras espécies do Cerrado como *Dimorphandra mollis* Benth., as concentrações de flavonoides totais foram influenciadas pelas diferentes doses de nitrogênio do solo, visto que foi verificado um ponto mínimo de flavonoides totais (1,29%) nas doses crescentes de N (200 mg DM⁻³), caracterizando um efeito de diluição destes metabólitos com o aumento da produção de fitomassa devido à aplicação de N (Fernandes et al., 2008).

Os alcaloides são aminas cíclicas que possuem nitrogênio na sua constituição. Esses compostos são de uma vasta família de metabólitos secundários encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas vasculares. O aumento nas concentrações destes metabólitos em plantas de *A. othonianum* na presença da dose de 15 mmol L⁻¹ de N aos 90 DAT pode estar relacionado ao deslocamento do recurso nitrogenado para produção deste metabólito como forma adaptativa, deixando o recurso, de ser alocado para a síntese da clorofila. Esta informação é corroborada pelos dados obtidos para clorofila total, que mostram redução na síntese deste pigmento a partir da dose estimada de 11,4 mmol L⁻¹ de N. Essa redução pode ser uma forma de resposta à exposição a alta concentração deste nutriente na solução. Por outro lado, a menor concentração de alcaloide foi detectada em plantas submetidas a 0 mmol L⁻¹ de N aos 90 DAT, que provavelmente ocorreu porque na ausência deste nutriente, as plantas de *A. othonianum* Rizz não induziram a rota de metabolismo secundário que leva à síntese desses compostos, como forma de resposta ao estresse nutricional. Em plantas de *Catharanthus roseus* sob alta concentração de CO₂ e teor de N moderado (50 Kg N ha⁻¹) foi verificado maiores concentrações de alcaloides totais, vimblastina e vinscristina (Singh et al., 2015). Outros tipos de estresse também podem afetar a síntese de alcaloides, como ocorre em plantas com altas capacidades adaptativas as condições de estresse climático como em folhas de *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich., que também foram encontradas a presença deste metabólito juntamente com compostos fenólicos (Christodoulakis et al., 2011).

Mudas de *A. othonianum* Rizz. em solução nutritiva tiveram seu metabolismo primário estimulado, podendo ser comprovado pelo aumento na síntese de polissacarídeos com as doses de 7,5; 10 e 12,5 mmol L⁻¹ de N (Figura 5) e clorofila total que alcançou o teor máximo na dose de 11,4 mmol L⁻¹ de N (Figura 4). Por outro lado, a ausência do N afetou todas as rotas metabólicas avaliadas nesta pesquisa, visto que compostos fenólicos, alcaloides e carboidratos tiveram suas produções limitadas nas mudas desenvolvidas em solução sem a adição de nitrogênio. A dose de 15 mmol L⁻¹

de N na solução nutritiva estimulou a síntese de alcaloides, no entanto, limitou a produção de carboidratos principalmente aos 90 DAT, além de afetar a síntese de clorofila e a densidade estomática, essenciais ao processo fotossintético.

Pode-se concluir que as características morfoanatômicas foliares bem como a produção de compostos fenólicos, carboidratos, alcaloides, teor de clorofila, carotenoides e densidade estomática foram afetadas pelas doses de nitrogênio fornecidas a mudas de caju-de-árvore-de-cerrado mantidas em solução nutritiva. Conclui-se também que a adubação nitrogenada é fundamental para a estruturação tecidual foliar em mudas de *A. othonianum* Rizz cultivadas em sistema hidropônico.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPEG (Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Goiás), pela concessão da bolsa de doutorado, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de pós-doutorado e apoio financeiro e à CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelos suportes financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências Bibliográficas

Aguiar, T.V.; Santanna-Santos, B.F.; Azevedo, A.A.; Ferreira, R. S. Anati Quanti: Software de analyses quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta Daninha*. v.25, p. 649-659, 2007.

Ahmad, N.; Zuo, Y.; Lu, X.; Anwar, F.; Hameed, S. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. *Food Chemistry*. v. 190, p. 80-89, 2016.

Bernal, M.; Verdaguer, D.; Badosa, J.; Abadía, A.; Llusà, J.; Peñuelas, J.; Núñez-Olivera, E.; Llorens, L. Effects of enhanced UV radiation and water availability on performance, biomass production and photoprotective mechanisms of *Laurus nobilis* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. v. 109, p. 264-275, 2015.

Bessa, L.A.; Silva, F.G.; Moreira, M.A.; Teodoro, J.P.R.; Soares, F.A.L. Characterization of the effects of macronutrient deficiencies in mangabeira seedlings. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 34, n. 4, p. 1235-1244, 2012.

Bessa, L.A.; Silva, F.G.; Moreira, M.A.; Teodoro, J.P.R.; Soares, F. A. L. Growth and nutrient accumulation of *Anacardium othonianum*Rizz. seedlings grown in nutrient solution. *Chilean Journal of Agricultural Research*. v. 73, n. 3, p. 301-308, 2013.

Cao, S.; Liang, M.; Shi, L.; Shao, J.; Song, C.; Bian, K.; Chen, W. Accumulation of carotenoids and expression of carotenogenic genes in peach fruit. *Food Chemistry*. v. 214, p. 137-146, 2017.

Christodoulakis, N.S.; Kolliaa, K.; Fasseas, C. Leaf structure and histochemistry of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (squirting cucumber). *Flora*. v. 206, p. 191-197, 2011.

Coelho, F.S.; Fontes, P.C.; FINGER, F.L.; CECON, P.R. Avaliação do estado nutricional do nitrogênio em batateira por meio de polifenóis e clorofila na folha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 47, n. 4, p. 584-592, 2012.

Dwyer, L.M.; Anderson, A.M.; MA, B.L. Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. *Canadian Journal of Plant Science*, v.75, p.179-182, 1995.

Epstein, E.; Bloom, A.J. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. Londrina: Editora Planta. 403p, 2006.

Fernandes, V. F.; Bezerra, L. A.; Mielke, M.S.; Silva, D.C.; Costa, L.C.B. Anatomia e ultraestrutura foliar de *Ocimum gratissimum* sob diferentes níveis de radiação luminosa. *Ciência Rural*. v. 44, n. 6, p. 1037-1042, 2014.

Fernandes, L.A.; Alves, D.S.; Silva, L.F.; Silva, N.C.A.; Martins, E.R.; Sampaio, R.A.; Costa, C.A. Níveis de nitrogênio, fósforo e potássio para a produção de mudas de fava

d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v. 10, n. 1, p. 94-99, 2008.

Figueredo, A.C.S.; Barroso, J.M.G.; Pedro, L.M.G.; Ascensão, L. Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos. Lisboa, 1ª Edição. Edição Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007.

Ferreira, D.F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010

Ferreira, T., W. Rasband. 2010. O ImageJ Guia do Usuário-Version 1,43 . Disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf> (acessado em março 2016).

Furr, M.; Mahlberg, P.G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. Journal of Natural Products, v.44, n.2, p.153-159, 1981.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

Gupta, P.; Bhatnagar, A.K. Spatial distribution of arsenic in different leaf tissues and its effect on structure and development of stomata and trichomes in mung bean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Environmental and Experimental Botany. v. 109, p. 12-22, 2015.

Haim, P.G.; Zoffoli, B.C.; Zonta, E.; Araújo, A. P. Diagnose nutricional de nitrogênio em folhas de feijoeiro pela análise digital de imagens. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 47, n. 10, p. 1546-1549, 2012.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Experiment Station. 32p. (Bulletin, 347), 1950.

Hurtado, S.M.C.; Silva, C.A.; Resende, A.V.; Corazza, E.J.; Shiratsuchi, L.S.; Higashikawa, F.S. Sensibilidade do clorofilômetro para diagnóstico nutricional de nitrogênio no milho. Ciência Agrotecnologia. v. 34, n. 3, p. 688-697, 2010.

Iqbal, N.; Khana, N.A.; Nazar, R.; Silva, J.A.T. Ethylene-stimulated photosynthesis results from increased nitrogen and sulfur assimilation in mustard types that differ in photosynthetic capacity. *Environmental and Experimental Botany*. v. 78, p. 84-90, 2012.

Jezler, C. N.; Mangabeira, P. A. O.; Almeida, A. F.; Jesus, R. M.; Oliveira, R. A.; Silva, D. C.; Costa, L. C. B. Pb and Cd on growth, leaf ultrastructure and essential oil yield mint (*Mentha arvensis* L.). *Ciência Rural*. v. 45, n. 3, p. 392-398, 2015.

Johansen, D.A. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill, 1940.

Kalacska, M.; Lalonde, M.; Moore, T. R. Estimation of foliar chlorophyll and nitrogen content in an ombrotrophic bog from hyperspectral data: Scaling from leaf to image. *Remote Sensing of Environment*. v. 169, p. 270-279, 2015.

Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. v. 27, p.137-138. 1965.

Kuki, K.N.; Oliva, M.A.; Gomes, F.P.; Costa, A.C. Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Schinus terebenthifolius* e *Cocos nucifera*. In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino-Americano de Fisiologia Vegetal, Recife. Anais, SBFV, 2005.

Larbat, R.; Paris, C.; Bot, J.L.; Adamowicz, S. Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Science*. v. 224, p. 62-73, 2014.

Lima, R.B.; Santos, T.B.; Vieira, L.G.E.; Ferrarese, M.L.L.; Ferrarese-Filho, O.; Donatti, L.; Boeger, M. R. T.; Petkowicz, C. L. O. Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica* L.). *Carbohydrate Polymers*. v. 93, p. 135-143, 2013.

Liu, Q.; Chen, X.; Wu, K.; Fu, X. Nitrogen signaling and use efficiency in plants: what's new? *Current Opinion in Plant Biology*. v. 27, p. 192-198, 2015.

Magolbo, L.A.; Carmo, E.L.; Garcia, E.L.; Fernandes, A.M.; Leonel, M. Dry matter accumulation and mineral nutrition of arracacha in response to nitrogen fertilization. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 50, n. 8, p. 669-680, 2015.

Majer, P.; Neugart, S.; Krumbeind, A.; Schreiner, M.; Hideg, E. Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environmental and Experimental Botany*. v. 100, p. 1-9, 2014.

Medeiros, L.T.; Pinto, J.C.; Castro, E.M.; Rezende, A.V.; Lima, C.A. Nitrogênio e as características anatômicas, bromatológicas e agrônômicas de cultivares de *Brachiaria brizantha*. *Ciência agrotecnologia*. v. 35, n. 3, p. 598-605, 2011.

Nascimento, H.H.C.; Santos, C.A.; Freire, C.S.; Silva, M.A.; Nogueira, R.J.M.C. Ajustamento osmótico em mudas de jatobá submetidas à salinidade em meio hidropônico. *Revista Árvore*. v. 39, n. 4, 2015.

O'Brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E. coloração policromático das paredes celulares da planta por azul de toluidina O . *Protoplasma*, v. 59, p.368-373, 1964.

O'Brien, T.P.; McCully, M.E. The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne: Termarcaphy Pty, 1981.

Oka, M.; Shimoda, Y.; Sato, N.; Inoue, J.; Yamazaki, T.; Shimomura, N.; Fujiyama, H. Abscisic acid substantially inhibits senescence of cucumber plants (*Cucumis sativus*) grown under low nitrogen conditions. *Journal of Plant Physiology*. v. 169, p. 789-796, 2012.

Perrone, R.; Salmeri, C.; Brulloc, S.; Colombo, P.; Castro, O. What do leaf anatomy and micro-morphology tell us about the psammophilous *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae) in response to sand dune conditions? *Flora*. v. 213, p. 20-31, 2015.

Prando, A.M.; Zucareli, C.; Fronza, V.; Oliveira, F.A.; Oliveira Junior, A. Características produtivas do trigo em função de fontes e doses de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. v. 43, n. 1, p. 34-41, 2013.

Reis, A.L.L.E.; Silva, D.S.; Silva, K.L.F.; Chagas, D.B. Caracterização anatômica e histoquímica de raízes e folhas de plântulas de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). *Revista Árvore*. v. 38, n. 2, p. 209-219, 2014.

Reyes, T.H.; Scartazza, A.; Lu, Y.; Yamaguchi, J.; Guglielminetti, L. Effect of carbon/nitrogen ratio on carbohydrate metabolism and light energy dissipation mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 105, p. 195-202. 2016.

Romualdo, L.M.; Luz, P.H.C.; Devechio, F.F.S.; Marin, M.A.; Zuniga, A.M.G.; Bruno, O.M.; Herling, V. R. Use of artificial vision techniques for diagnostic of nitrogen nutritional status in maize plants. *Computers and Electronics in Agriculture*. v. 104, p. 63-70, 2014.

Rubio-Wilhelmi M.M, Sanchez-Rodriguez E, Rosales MA, Blasco B, Rios JJ, Romero L, et al. Effect of cytokinins on oxidative stress in tobacco plants under nitrogen deficiency. *Environmental Experimental Botany*. v. 72, p. 167-173, 2011.

Schlemmer, M.; Gitelsonb, A.; Schepers, J.; Ferguson, R.; Peng, Y.; Shanahana, J.; Rundquist, D. Remote estimation of nitrogen and chlorophyll contents in maize at leaf and canopy levels. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*. v. 25, p. 47-54, 2013.

Siqueira-Silva, A.I.; Silva, L.C.; Azevedo, A.A.; Oliva, M.A. Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 78, p. 265-275, 2011.

Silva Júnior, J. M.; Rodrigues, M.; Castro, E. M.; Bertolucci, S. K.; Pasqual, M. Changes in anatomy and chlorophyll synthesis in orchids propagated *in vitro* in the presence of urea. *Acta Scientiarum Agronomy*. v. 35, n. 1, p. 65-72, 2013.

Singh, A.; Pandey, B.; Kumari, S.; Agrawal, M. Nitrogen availability modulates CO₂-induced responses of *Catharanthus roseus*: Biomass allocation, carbohydrates and alkaloids profile. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. v. 2, p. 160-167, 2015.

Sousa, A.G.O.; Fernandes, D.C.; Alves, A.M.; Freitas, J.B.; Naves, M.M.V. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. *Food Research International*. v. 44, p. 2319-2325, 2011.

Sousa, L.B.; Heitor, L.C.; Santos, P.C.; Freitas, J.A.A.; Freitas, M.S.M.; Freitas, S. J.; Carvalho, A.J.C. Crescimento, composição mineral e fenóis totais de espécies de *Passiflora* em função de fontes nitrogenadas. *Bragantia*. v. 72, n. 3, p. 247-254, 2013.

Souza, P.L.C.; Silva, M.R. Quality of granola prepared with dried caju-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) and baru almonds (*Dipteryx alata* Vog). *Journal of Food Science and Technology*. v. 52, p. 1712-1717, 2015.

Shukri, M.A.M.; Alan, C. Analysis of phenolics in *Anacardium occidentale* shoot extracts using a reversed-phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS). *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. v. 38, n. 2, p.221-230, 2010.

Theago, E.Q.; Buzetti, S.; Teixeira Filho, M.C.; Andreotti, M.; Megda, M.M.; Benett, C.G.S. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio influenciando teores de clorofila e produtividade do trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v. 38, p. 1826-1835, 2014.

Tholen, D.; Carolina, B.; Zhu, X.G. Opinion: Prospects for improving photosynthesis by altering leaf anatomy. *Plant Science*. v. 197, p. 92-101, 2012.

Vieira, R.F.; Costa T.S.A.; Silva, D.B.; Ferreira, F.R.; Sano, S.M. Frutas nativas da região Centro-Oeste. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

Wang, S.; Liang, D.; LI, C.; Hao, Y.; Ma, F.; Shu, H. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 51, p. 81-89, 2012.

Wei, F.; Zhang, H.Y.; Guo, B.B.; Yun, Z.J.; Wang, C.Y.; Guo, C. Assessment of plant nitrogen status using chlorophyll fluorescence parameters of the upper leaves in winter wheat. *European Journal of Agronomy*. v. 64, p. 78-87, 2015.

Wellburn, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, v. 144, p. 307-313, 1997.

Xu, G., Fan, X., Miller, A.J. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Plant Biology*. v. 63. 153-162, 2012.

Yan, F.; Sol, Y.; Canção, F.; Liu, F. Differential responses of stomatal morphology to partial root-zone drying and deficit irrigation in potato leaves under varied nitrogen rates. *Scientia Horticulturae*. v. 145, p. 76-83, 2012.

Yang, Y.; Yua, L.; Wanga, L.; Guo, S. Bottle gourd rootstock-grafting promotes photosynthesis by regulating the stomata and non-stomata performances in leaves of watermelon seedlings under NaCl stress. *Journal of Plant Physiology*. v. 186-187, p. 50-58, 2015.

Yuan, Z.; Ata-Ul-Karim, S.; Cao, Q.; Lu, Z.; Cao, W.; Zhu, Y.; Liu, X. Indicators for diagnosing nitrogen status of rice based on chlorophyll meter readings. *Field Crops Research*. v. 185, p. 12-20, 2016.

CAPÍTULO II

Influência da adubação nitrogenada no crescimento, na absorção de nutrientes e atividade enzimática de plantas de *Anacardium othonianum* Rizz. em solução nutritiva

Resumo

A disponibilidade de nutrientes interfere diretamente no crescimento e no desenvolvimento vegetal. O nitrogênio é um dos nutrientes mais requeridos pelas plantas, pela sua importância na síntese de compostos orgânicos fisiologicamente essenciais. Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar o efeito de doses N sobre o crescimento, absorção de nutrientes e atividade enzimática para a produção de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) em solução nutritiva. O experimento foi conduzido em sistema hidropônico. Os tratamentos foram constituídos pelas doses de nitrogênio de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹. Nas determinações efetuadas, aos 120 dias após o transplante das mudas para solução nutritiva, houve sintomas de excesso de N como redução no número de folhas e áreas foliares da planta e quarta folha. O número máximo de folhas foi obtido na dose 10,7 mmol L⁻¹ de N. A dose de N não influenciou os teores de Fe e Cu na quarta folha. O teor de N na matéria seca da quarta folha foi 2,78 g kg⁻¹. A dose de 2,5 mmol L⁻¹ de N induziu a atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase, enquanto a ausência de nitrogênio aumentou a síntese do óxido nítrico em mudas de *A. othonianum* Rizz., em solução nutritiva.

Palavras-chave: Hidroponia, nutrição mineral, metabolismo nitrogênio, frutíferas.

Introdução

O cerrado brasileiro possui grande diversidade de espécies frutíferas com potencial econômico. Dentre estas, o *Anacardium othonianum* Rizz vem se destacando pelo aproveitamento de seus frutos na indústria alimentícia e de sua árvore no reflorestamento de áreas degradadas. No entanto, a produção em larga escala desta frutífera é limitada pela falta de conhecimento quanto à fisiologia, a exigência e os efeitos dos nutrientes que permitem seu estabelecimento em campo. Com o conhecimento dos requisitos nutricionais da espécie, fica possível fornecer uma nutrição adequada, deixando-a menos susceptível ao aparecimento de doenças e ao ataque de microrganismos, além de mais resistente ao estresse hídrico e a vários outros fatores abióticos (Dias et al., 2012).

Dentre os nutrientes, o nitrogênio tem um papel fundamental principalmente durante as fases iniciais do desenvolvimento vegetal, tanto pela sua importância fisiológica, quanto ao seu papel na cinética de absorção com outros nutrientes (Dias et al., 2012). Contudo, a resposta de plantas à adubação nitrogenada, principalmente em solos tropicais, torna-se menos frequente em virtude das grandes perdas por volatilização, lixiviação, o impacto ambiental e ainda pelos gastos onerosos para manter a produção (Martins et al., 2013). Na maioria dos sistemas de produção agrícola cerca de 50 a 75% do N aplicado acaba se perdendo e não são utilizados pelas plantas (McAllister et al., 2012; Meena et al., 2016). Desta forma, importância deve ser atribuída para melhorar a eficiência do uso do nitrogênio, levando redução dos gastos e aumento na produção (Thomsen et al., 2014).

Conhecer a exigência de N pela planta é fundamental para o desenvolvimento vegetal, pois este nutriente contribui para a síntese de diversos compostos orgânicos, como aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (Chrysargyris et al., 2016). Além disso, qualquer tipo de estresse pode alterar a disponibilidade nutricional, a assimilação e o metabolismo de N nas plantas, bem como a atividade de algumas enzimas essenciais no metabolismo do N como Glutamina sintetase (GS) e nitrato redutase (NR).

A NR é considerada um elemento “chave” no processo de assimilação e utilização do N nas plantas, por ser a primeira enzima na via de assimilação do nitrato (Antoniou et al., 2013). NR catalisa a transferência de elétrons a partir de 2 NADPH para produzir nitrito a partir do nitrato, que depois é reduzido a NH_4^+ pela enzima nitrito

reductase (Epstein e Bloom, 2006). Esta enzima pode ser rapidamente ativada/desativada por fosforilação ou desfosforilação, respectivamente, em resposta aos estímulos ambientais e às condições de exposição da planta. Alternativamente, a NR também catalisa a redução de um elétron do nitrito para formar ON utilizando NADPH como doadores de elétrons, constituindo uma função fisiológica alternativa desta enzima em plantas (Rosales et al., 2012), principalmente sob estresse.

O ON é uma importante molécula sinalizadora de muitos processos fisiológicos importantes nas plantas, assim como as espécies reativas de oxigênio (EROs). O ON está envolvido nas respostas a vários estímulos ambientais, bióticos e abióticos (Antoniou et al., 2013). O papel antioxidante do ON é baseado principalmente na sua capacidade de manter a homeostase redox celular e regulamentar a toxicidade das EROs (Quiao et al., 2008). ON fazendo o papel de uma molécula sinalizadora tem função de aliviar os efeitos deletérios causados pelo estresse.

O metabolismo do nitrogênio também é estimulado pela enzima GS que durante décadas tem sido estudada nas pesquisas vegetais, devido ao seu importante papel na assimilação do N inorgânico. Nas plantas esta enzima é essencial na catalisação da reação dependente de ATP, que permite a conversão de glutamato em glutamina, utilizando amônio derivado da absorção primária do nitrogênio (Orsel et al., 2014).

Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar o efeito de doses N sobre o crescimento, absorção de nutrientes e atividade enzimática para a produção de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) em solução nutritiva.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido entre os meses de junho a novembro de 2014 em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

A coleta dos frutos de caju-de-árvore-do-cerrado ocorreu na fazenda Gameleira no município de Montes Claros – GO nos seguintes pontos geográficos: 16.09436° S - 51.21617° O a 385 m de altitude; 16.10698° S - 51.27012° O a 412 m; 16.11594° S - 51.27737° O a 404 m; 16.13295° S - 51.29675° O a 595 m; 16.13266° S – 51.30228° O a 609 m.. A exsicata do material vegetal está depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, sob o número de coleta 3793. Após a coleta, os frutos foram despulpados manualmente em água corrente para a obtenção das sementes. A

umidade de superfície das sementes foi retirada por secagem com toalhas de papel à temperatura ambiente. As sementes foram tratadas com fungicida Vitavax-Thiram [Ingrediente ativo (carboxina + thiram): 200 + 200 g L⁻¹], utilizando 300 mL de fungicida por 100 Kg de sementes e secaram-se em contato direto com gel de sílica em tabuleiros de plástico (35 x 30 x 8 cm) até atingir o nível de 13% de umidade. Posteriormente as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em BOD a 10°C. As sementes foram armazenadas em BOD a 10°C durante sete meses.

A semeadura foi realizada em bandejas plásticas (50x35x8 cm) contendo areia lavada como substrato. Após 30 dias da semeadura quando as plantas se encontravam com 3 a 4 folhas definitivas, as mudas foram transplantadas para os vasos de sistema hidropônico com capacidade de oito litros, contendo solução nutritiva com ½ força iônica de cada tratamento da solução de Hoagland e Arnon (1950), e permaneceram por 30 dias para adaptação. Após este período, as plantas foram submetidas aos tratamentos constituídos por sete doses de N (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 mmol L⁻¹).

Durante a condução do experimento as plantas foram cultivadas sob irradiância média de 584,75 μmol m² s⁻¹, a solução nutritiva mantida sob aeração constante com ar comprimido. O pH foi ajustado diariamente a 5,5 ± 0,5 com adição de HCl ou NaOH, quando necessário e, a troca da solução nutritiva realizada com o critério de 30% de depleção do valor inicial da condutividade elétrica.

Aos 120 dias após o transplântio das mudas para as soluções contendo os tratamentos, foram determinadas as características de crescimento da planta: comprimento do caule, comprimento da raiz, número de folhas, número de nós, diâmetro de caule, área foliar (da quarta folha e da planta inteira) e massas da matéria seca (folha, caule, raiz e total), além de determinados os teores de N, P, K, Mg, Ca, S, B, Fe, Mn, Mo, Cu e Zn, e óxido nítrico e as atividades da glutamina sintetase e nitrato redutase.

Características de crescimento

O comprimento do caule (CC) foi determinado na região compreendida entre o colo e o meristema apical da haste principal e o comprimento da raiz com a medição do maior comprimento da raiz primária, com o auxílio de uma régua graduada. O diâmetro do caule foi avaliado na altura do colo da muda com o uso de paquímetro digital. A área foliar total e da quarta folha foi obtida a partir da integração das imagens das folhas em um *software* (ImageJ gratuito de código aberto -

<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) de tratamento de imagens (Ferreira e Rasband, 2010).

Teor Nutricional

As plantas de caju-de-árvore-do-cerrado foram coletadas e separadas em folhas, caule e raízes. As partes separadas das plantas foram secadas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até a massa da matéria seca constante e então pesadas para obter a massa da matéria seca. Posteriormente, estas foram moídas em moinho tipo Willey, equipado com peneira de 20 mesh e determinado os teores dos nutrientes N, P, K, Mg, Ca, S, B, Fe, Mn, Mo, Cu, e Zn de acordo com a metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

Teor de óxido nítrico

O teor de ON foi determinado através da metodologia descrita por Zhou et al. (2005) que tem como base a utilização do reagente de Griess. Amostras de 0,6 g de folhas foram maceradas em almofariz e pistilo, homogeneizadas com 3 mL de 50 mM de tampão ácido acético (pH 3,6 contendo 4% de diacetato de zinco) e filtradas. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 g durante 15 min a 4°C. No sobrenadante foi adicionado 1 mL do reagente de Griess e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 min. A leitura da absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro UV (VIS modelo Evolution 60S). O teor de ON obtido foi correlacionado com a curva padrão para NaNO₂. Os resultados obtidos foram expressos em nmoL de óxido nítrico por grama de massa da matéria fresca (nmoL g⁻¹ MF).

Atividades enzimáticas:

Glutamina sintetase (GS)

Amostras foliares pesando 1,0 g foram maceradas em nitrogênio líquido. O extrato enzimático foi obtido utilizando o tampão de extração (0,05M de imidazol – HCl, pH 7,2, contendo 0,5 mM EDTA e 1,0 mM dithiothreitol), acrescido de solução de 36 µmoL de ATP, 90 µmoL de MgSO₄, 12 µmoL de hidroxilamina, 184 µmoL de L-glutamato e 100 µmoL de imidazol - HCl. O volume final foi de 2 mL e o pH de 7,2. As amostras foram incubadas em banho-maria a 30°C por 30 minutos. A atividade da GS foi determinada como descrita por Rhodes e Stewart (1974). Após a incubação, alíquotas de 0,8 mL das amostras foram adicionadas a 1,2 mL de cloreto férrico - (10%) TCA (24 %) HCl (6N), 1:1:1 – formando complexo marrom amarelado como precipitado. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 500 rpm e o sobrenadante utilizado em leitura colorimétrica para determinar a formação de λ-glutamil

hidroxamato. A leitura da absorvância foi medida a 540 nm, em espectrofotômetro UV (VIS modelo Evolution 60S), sendo a determinação da atividade enzimática realizada a partir da comparação da leitura obtida com a curva padrão. A atividade da GS foi expressa em μmolar de glutamil hidroxamato por minuto por grama de proteína (μM de $\lambda\text{-GH min}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína).

Nitrato redutase (NR)

A atividade da NR foi avaliada pelo método *in vivo* determinado por Radin (1974). As amostras de folhas foram coletadas entre 09 h e 10 h, armazenadas em sacos plásticos e colocadas em caixa de isopor com gelo. Em seguida foram pesadas 100 mg de massa da matéria fresca, maceradas e colocadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução tampão fosfato, (pH 7,4, 50mM) + KNO_3 (200 mM). As amostras foram infiltradas a vácuo durante cinco minutos e posteriormente, os tubos de ensaio com o material foliar foram transferidos para o banho-maria a 33°C , durante trinta minutos e envolvidos com folhas de papel alumínio para evitar o contato com a luz.

A reação foi estabilizada com a adição de 1 mL de sulfanilamida a 1% em HCl 2 N, posteriormente foi adicionado 1 mL de naftilenodiamino 0,05%. A leitura da absorvância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da enzima determinada pela quantidade de nitrito (NO_2^-) produzida, comparando os valores obtidos com a curva padrão. Os resultados obtidos foram expressos em μmol de nitrito por hora por grama de massa da matéria fresca ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF).

Delineamento e Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída por dois vasos, com duas plantas por vaso. As variáveis de crescimento, exceto área foliar e os teores nutricionais foram submetidos as análises de variância e regressão, sendo os modelos de regressão escolhidos baseados nos maiores coeficientes de determinação, na significância dos coeficientes de regressão e utilizando o teste t ao nível de até 5% de probabilidade. A área foliar (total e da quarta folha), o teor de ON e a atividade das enzimas GS e RN foram submetidas a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Sisvar® (Ferreira, 2010).

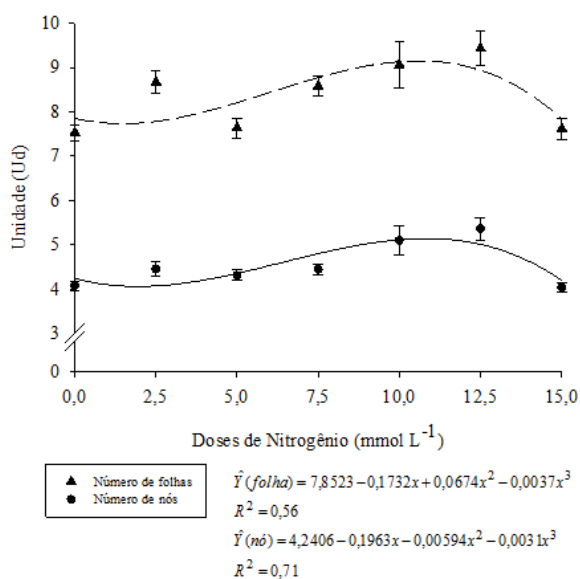
Resultados

Crescimento

As características de crescimento das plantas de *A. othonianum* Rizz. foram influenciadas pelas diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva, exceto os comprimentos do caule e da raiz que não foram influenciados pelas doses de N, atingindo os valores médio de 11,19 e 10,95 cm, respectivamente. Os números de folhas e de nós atingiram os valores máximos estimados de 9,18 ud e 5,14 ud, respectivamente, quando expostos às doses de 10,7 e 10,8 mmol L⁻¹ de N (Figura 1a). O maior valor de diâmetro do caule de 5,09 mm foi observado na dose de 0 mmol L⁻¹ de N e o menor diâmetro de 4,49 mm, na maior dose de 15 mmol L⁻¹ de N (Figura 1b).

As áreas foliares da planta inteira e da quarta folha foram influenciadas pelas doses de nitrogênio disponibilizadas para as mudas de *A. othonianum* Rizz em solução nutritiva (Tabela 1). Os maiores valores médios para área foliar da planta inteira foram obtidos nas doses de 7,5 e 10 mmol L⁻¹, 143,96 cm² e 146,39 cm², respectivamente. Apesar de não ter ocorrido diferença entre as doses de N 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹, houve tendência de diminuição da área foliar ao utilizar as doses de N superiores a 10 mmol L⁻¹. As plantas submetidas às doses de 12,5 e 15 mmol L⁻¹ de N obtiveram 129,45 e 93,27 cm² de área foliar, respectivamente. Na quarta folha o maior valor médio para área foliar ocorreu nas plantas expostas à dose de 10 mmol L⁻¹ de N. Em doses superiores a essa, também foi observado diminuição na área da quarta folha, apesar de não haver diferenças entre as doses de 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹, os valores médios nas doses de 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹ de N foram de 44,87 e 43,30 cm², respectivamente.

a)



b)

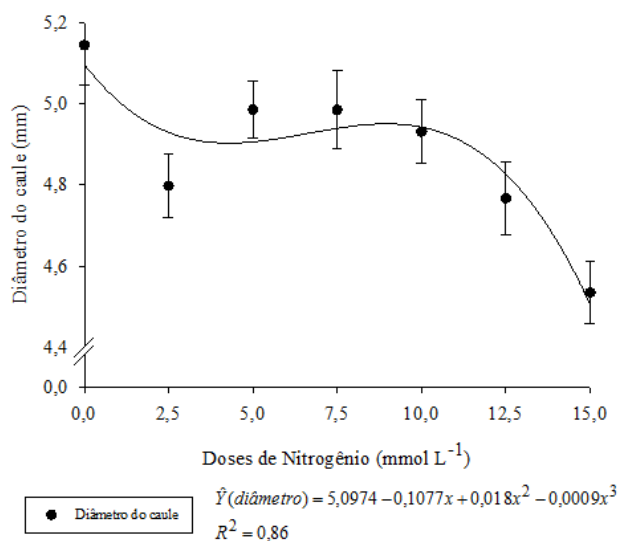


Figura 1. Número de folhas, número de nós e diâmetro do caule de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva.

Tabela 1. Área foliar (cm²) da planta e da quarta folha de mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) cultivadas em diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva.

Doses de N (mmol L ⁻¹)	Área foliar (cm ²)	
	Planta	Quarta folha
0,0	76,50 bc	34,12 ab
2,5	126,16 ab	31,59 b
5,0	61,62 c	37,60 ab
7,5	143,96 a	42,72 ab
10,0	146,39 a	48,79 a
12,5	129,45 ab	44,87 ab
15,0	93,27 abc	43,30 ab
C.V (%)	18,09	19,94

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Massa da matéria seca

As massas da matéria seca da folha, raiz e total foram influenciadas estatisticamente pelas diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva (Figura 2), enquanto não houve diferença estatística entre a massa da matéria seca do caule e as doses de N, o valor médio obtido para MSC (Massa seca do caule) foi de 0,53 g (Figura 2a). Os valores máximos estimados de massas da matéria seca das folhas, raízes e total foram de 0,905 g, 1,022 g e 2,287 g (Figuras 2a e 2b), respectivamente nas plantas submetidas às doses de 10,5; 0,0 e 10,7 mmol L⁻¹ de N.

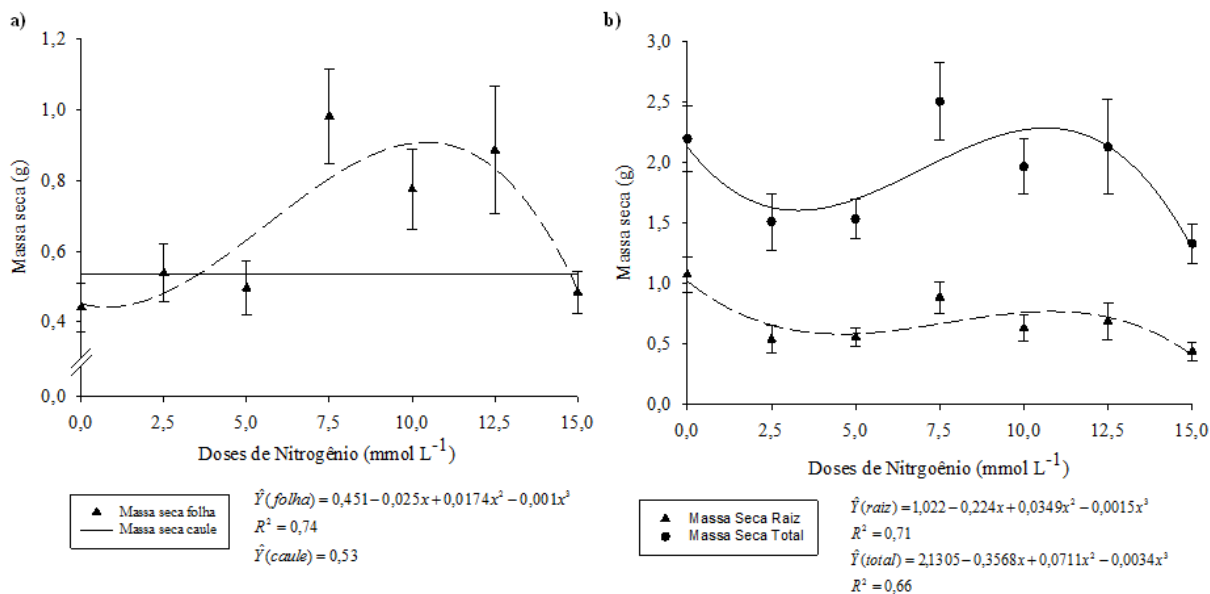


Figura 2. Massa da matéria seca da folha, caule, raiz e total de mudas de aju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva.

Teor de macronutrientes

Os teores de nitrogênio nas folhas e nas raízes foram influenciados pelas doses de nitrogênio em solução nutritiva (Figura 3a). Porém, o teor de N no caule não sofreu influência das diferentes doses de N, tendo atingido o valor médio de 3,64 g kg⁻¹. Os valores máximos estimados de N nas folhas foram de 3,16 g kg⁻¹ e nas raízes de 5,29 g kg⁻¹, nas doses estimadas de 9,7 e 14,4 mmol L⁻¹ de N, respectivamente (Figura 3a).

Os teores de fósforo foram influenciados pelas doses de nitrogênio nas folhas e nas raízes (Figura 3b). No caule, o teor de P, não ocorreu influência das doses de N, apresentando o valor médio de 1,47 g kg⁻¹. Os maiores valores estimados de P nas folhas foi de 0,62g kg⁻¹ na dose de 0 mmol L⁻¹ de N e nas raízes foi 1,72 g kg⁻¹ na dose de 15 mmol L⁻¹ de N.

As diferentes doses de nitrogênio também influenciaram o teor de potássio (Figura 3c). Sob ausência de N na solução (0 mmol L⁻¹) foram atingidos os maiores valores estimados para os teores de K, 2,54; 1,75 e 1,90 g kg⁻¹ nas folhas, caules e raízes, respectivamente. O aumento das doses de N na solução nutritiva diminuiu os teores de K até as doses de 11,9; 9,1 e 13,0 mmol L⁻¹ de N para as folhas, caules e raízes.

Apenas o teor de Ca nas folhas foi influenciado pelas diferentes doses de N em solução nutritiva (Figura 3d). O maior valor estimado do teor de cálcio foliar foi de 0,75 g Kg⁻¹ na dose de 0 mmol L⁻¹ de N. O aumento das doses de N na solução nutritiva diminuiu o teor de Ca nas folhas. Os valores médios de cálcio no caule e nas raízes foram de 0,91 e 0,20 g Kg⁻¹ respectivamente.

Os teores de Mg no caule e nas raízes não foram influenciados pelas diferentes doses de N, em solução nutritiva (Figura 3e). Os valores médios de Mg obtidos no caule e raízes foram de 0,51 e 0,43 g Kg⁻¹ respectivamente. Porém, o teor de Mg nas folhas foi influenciado pelas doses de N, atingindo o maior valor estimado de 0,391 g kg⁻¹ na ausência de N (dose de 0 mmol L⁻¹). O aumento das doses de N na solução nutritiva diminuiu o teor de Mg nas folhas até a dose de 12,8 mmol L⁻¹ de N.

Os teores de enxofre das folhas, caule e raízes não foram influenciados pelas diferentes doses de nitrogênio, em solução nutritiva, atingindo os valores médios de 0,02, 0,08 e 0,12 g kg⁻¹, respectivamente.

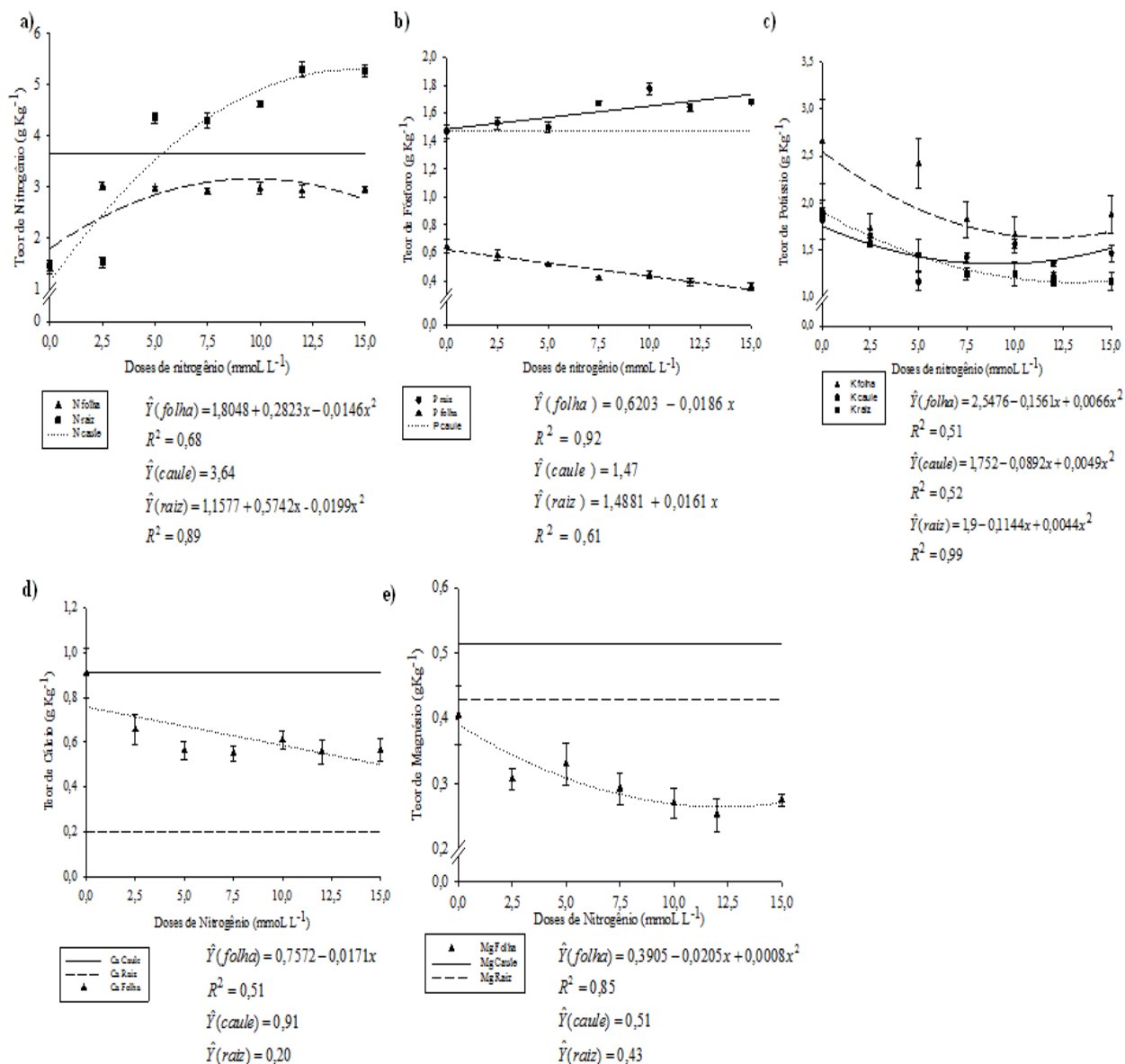


Figura 3. Teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva. a) Teor de N nas folhas, caule e raízes; b) Teor de P nas folhas, caule e raízes; c) Teor de K nas folhas, caule e raízes; d) Teor de Ca nas folhas, caule e raízes; e) Teor de Mg nas folhas, caule e raízes.

Teor de micronutrientes

Os teores dos micronutrientes Fe, Mn, Mo, Cu e Zn não foram influenciados pelas diferentes doses de nitrogênio na solução nutritiva, em nenhuma das partes vegetais avaliadas. Os valores médios obtidos para Fe, Mn, Mo, Cu e Zn, respectivamente foram nas folhas de 571,18; 122,32; 0,13; 12,29 e 38,71 mg Kg⁻¹, no caule, 425,39; 53,61; 0,13; 16,89 e 43,43 mg Kg⁻¹ e nas raízes 1210,32; 134,75; 0,14; 20,54 e 42,29 mg Kg⁻¹.

O teor de boro foliar foi o único, entre os teores de micronutrientes influenciados pelas doses de N (Figura 4). O maior valor de B foliar estimado foi de 113,13 mg g⁻¹ na dose de 0 mmol L⁻¹ de N. Os teores de B no caule e raízes obtiveram valores médios de 73,79 mg Kg⁻¹ e 79,26 mg Kg⁻¹, respectivamente.

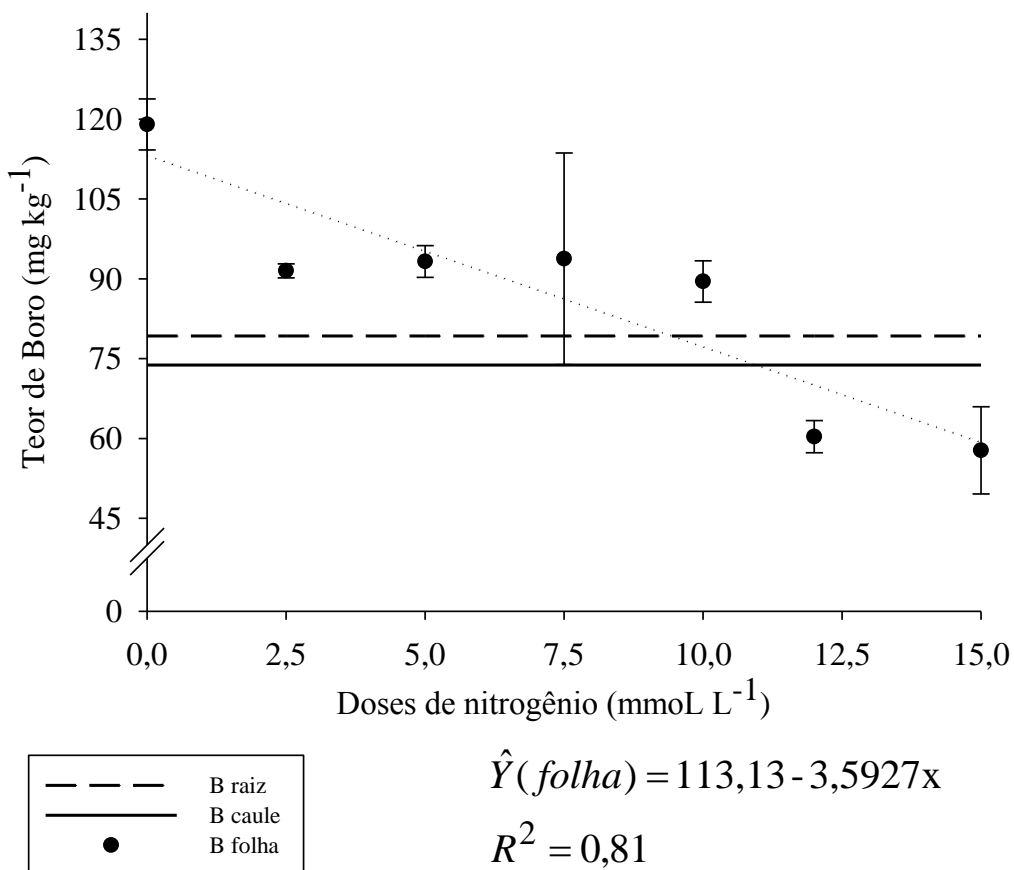


Figura 4. Teores de boro nas folhas, no caule e nas raízes em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva.

Teor de macronutrientes na quarta folha

Os teores de Mg e S na quarta folha das mudas de *A. othonianum* Rizz não foram influenciados pelas diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva. Os valores médios obtidos foram 0,16 e 0,04 g Kg⁻¹ respectivamente. No entanto, os teores de N, P, K e Ca na quarta foram influenciados pelas doses de N (Figura 5a, 5b, 5c, 5d).

O valor máximo estimado do teor de N na quarta folha foi de 2,78 g kg⁻¹ na dose de 14,2 mmol L⁻¹ de N (Figura 5a).

Os maiores teores de P, K e Ca estimados na quarta folha foram obtidos na dose 0 mmol L⁻¹ de N, sendo os valores 0,83; 2,35 e 0,67 g kg⁻¹, respectivamente. O aumento das doses de N na solução nutritiva diminuiu os teores de P, K e Ca na quarta folha até as doses de 10,2; 6,9 e 13,2 mmol L⁻¹ de N, respectivamente (Figuras 5b, 5c e 5d).

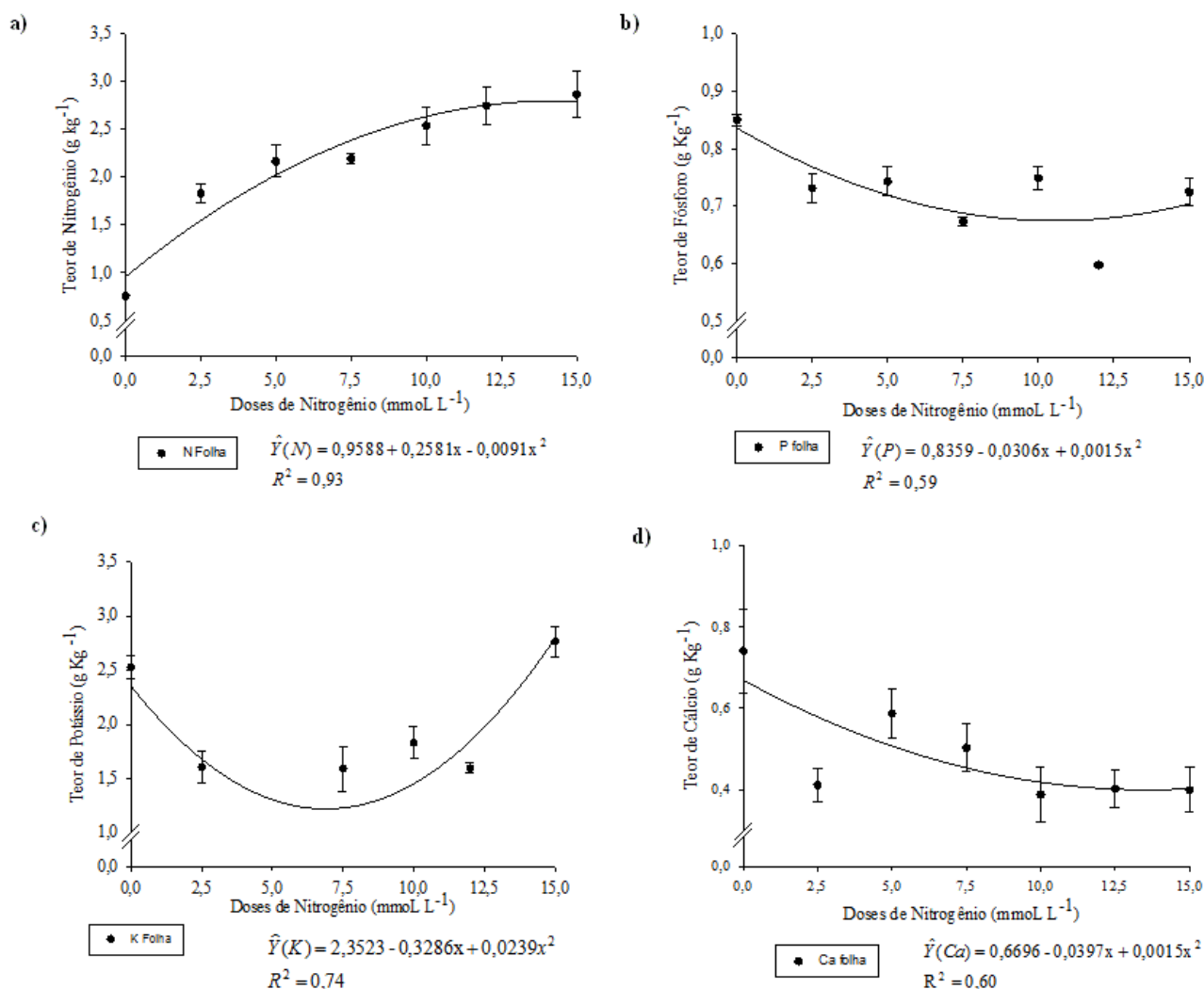


Figura 5. Teores de macronutrientes (N, P, K e Ca) na quarta folha em mudas de caju-do-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹) de nitrogênio em solução nutritiva. a) Teor de N; b) Teor de P; c) Teor de K; d) Teor de Ca.

Teor de micronutrientes na quarta folha

Os teores de Zn e Mn na quarta folha foram influenciados pelas doses de nitrogênio em solução nutritiva (Figura 6a e 6b). O maior valor estimado de teor de Zn foi de 36,86 mg g⁻¹ na dose de 15 mmol L⁻¹ de N, enquanto o maior valor do teor de Mn foi de 76,42 mg g⁻¹ nas mudas cultivadas sob a ausência de N da solução (0 mmol L⁻¹).

Os teores de Fe e Cu na quarta folha não foram influenciados pelas diferentes doses de nitrogênio em solução nutritiva, os valores médios estimados foram de 163,00 e 42,53 mg g⁻¹, respectivamente.

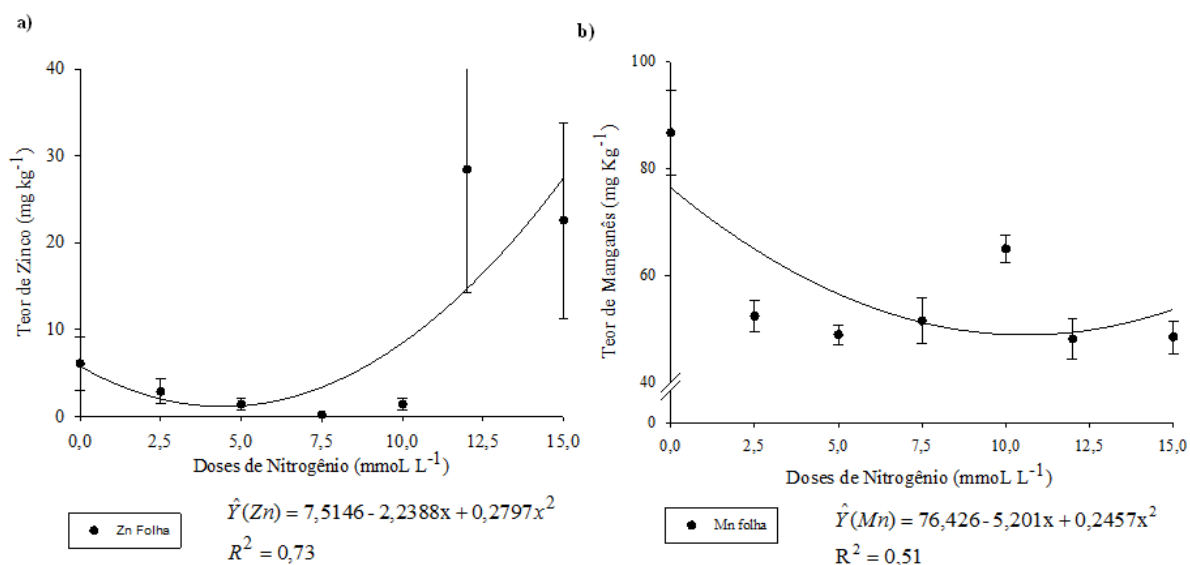


Figura 6. Teores de micronutrientes (Zn e Mn) na quarta folha em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L^{-1}) de nitrogênio em solução nutritiva a) Teor de Cu; b) Teor de Zn.

Enzimas do metabolismo do nitrogênio e óxido nítrico

As atividades das enzimas GS, NR e os teores de ON foram influenciados pelas doses de N, em solução nutritiva (Tabela 2). O maior valor médio obtido para a atividade da GS foi de $2,48 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ na dose de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de N.

Apesar de não haver estatística entre as doses 0,0; 2,5 e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de N para a atividade da NR, observou-se a maior atividade da NR ($13,30 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) na dose de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de N.

O teor de ON foi influenciado pelas doses de N em solução nutritiva (Tabela 2). O maior valor médio de ON, $14,06 \text{ nmol g}^{-1} \text{ MF}$ foi obtido na ausência de nitrogênio, apesar de não haver diferença entre as doses de 0,0 a 10 mmol L^{-1} de N (Tabela 2). O menor valor médio do teor de ON $0,09 \text{ nmol g}^{-1} \text{ MF}$ foi obtido na dose de 15 mmol L^{-1} de N.

Tabela 2. Atividade das enzimas Glutamina sintetase - GS ($\mu\text{M de } \lambda\text{-GH m}^{-1} \text{g}^{-1}$ proteína) e nitrato redutase - NR ($\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ MF}$) e teor de óxido nítrico - ON ($\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$) em mudas de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) cultivadas em diferentes doses (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$) de nitrogênio em solução nutritiva

Doses de N (mmol L ⁻¹)	GS ($\mu\text{M de } \lambda\text{-GH m}^{-1}$ g ⁻¹ proteína)	NR ($\mu\text{mol NO}_2\text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ MF)	ON (nmol g ⁻¹ MF)
0,0	2,05 b	10,44 ab	14,06 a
2,5	2,48 a	13,30 a	12,65 ab
5,0	2,14 b	8,32 b	12,24 ab
7,5	2,07 b	6,20 b	13,05 ab
10,0	1,96 b	9,74 ab	5,50 abc
12,5	2,14 b	8,44 b	0,72 bc
15,0	2,05 b	7,59 b	0,09 c
C.V (%)	21,07	17,32	29,94

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Discussão

Crescimento

Houve efeito das doses de N sobre o número de folhas e de nós (Figura 1). O aumento das doses de N proporcionou ascensão e queda no valor do número de folhas e nós, ocorrendo a ascensão nas doses de 10,7 e 10,8 mmol L⁻¹ de N, respectivamente e queda em doses superiores. Isso pode ser explicado por um possível efeito de toxidez provocado por excesso de nitrogênio na solução nutritiva, ocorrido ao submeter as mudas de *A. othonianum* Rizz. as doses superiores a 10,7 e 10,8 mmol L⁻¹ de N. O excesso, bem como a ausência de nitrogênio pode afetar o crescimento das plantas, pois altas concentrações de N podem alterar a absorção de outros nutrientes (Malavolta, 2006). Em mudas de *Psidium guajava* L. a partir da dose de 770 mg d⁻³ de N também foi observado a diminuição no número de folhas (Dias et al., 2012).

Em plantas de *A. othonianum* Rizz. o aumento das doses de nitrogênio em solução nutritiva reduziu o diâmetro do caule, sendo que a ausência de N estimulou o crescimento do diâmetro caulinar. Isso pode ser explicado como resposta adaptativa desta espécie, que na tentativa de absorver nitrogênio e disponibilizá-lo aos tecidos, sobretudo foliares, investiu energeticamente em formação de tecidos de condução. Fato semelhante também ocorreu em plantas de *Calophyllum brasiliense* Cambèss, que com o aumento das doses de nitrogênio disponível, reduziram o

diâmetro do caule (Ciriello et al., 2014). Em mudas de *Psidium guajava* L. plantas submetidas a doses superiores a 667 mg dm^{-3} de N foi observada diminuição de 0,62 mm de diâmetro do caule (Dias et al., 2012). Em frutos de *Ananas comosus* L. cv. “vitória”, o comprimento do caule e o diâmetro foram influenciados pelas doses de nitrogênio com o valor máximo de 15,3 cm, com 723 kg ha^{-1} de N para comprimento de fruto, e $12,7 \text{ cm}^2$ com 689 kg ha^{-1} de N para diâmetro de fruto (Caetano et al., 2013).

As áreas foliar total e na quarta folha foram influenciadas pelas doses de N em solução nutritiva (Tabela 1). Apesar de ter ocorrido diferença entre os valores médios, observou-se que as plantas submetidas às doses superiores de 10 mmol L^{-1} de N houve a diminuição tanto da área foliar total, quanto na área da quarta folha. O crescimento da área foliar das culturas tem sido relacionado com a disponibilidade de nitrogênio, entretanto doses excessivas de N podem causar toxidez, pois existe relação quanto ao suprimento ideal de N e o estímulo à expansão da área foliar, pois a expansão na área da folha pode inclusive ser usada como abordagem na estimativa da demanda de N assimilado pelas plantas (Ata-Ul-Karim et al., 2014).

Massa da matéria seca

Nas doses superiores a $10,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio foi observada diminuição na massa da matéria seca total em plantas de *A. othonianum* Rizz., o que pode ter ocorrido pelo efeito gerado por doses excessivas de nitrogênio, que geram estresse por toxidez e conseqüentemente diminuição na massa da matéria seca. Comportamento semelhante foi observado por Dias et al. (2012) quando observaram aumento na massa da matéria seca total em mudas de *Psidium guajava* L., até a dose de 865 mg dm^{-3} de N. Doses superiores a essa, induziram a diminuição na massa da matéria seca total.

Teor de macronutrientes

O teor máximo de nitrogênio foi encontrado nas raízes. Isso se deve ao fato deste ser o órgão vegetal requerido diretamente para a absorção do N presente na solução, a maior absorção de N pelas raízes foi observada nas plantas submetidas à dose de $14,4 \text{ mmol L}^{-1}$. Sob doses superiores a essa, foi verificada a diminuição na absorção de N pelas raízes. Esse efeito é indicação de que doses de N acima de $14,4 \text{ mmol L}^{-1}$ foram consideradas excessivas pelas plantas de *A.*

othonianum Rizz. Nitrogênio em excesso nas plantas pode afetar o crescimento e a produtividade (Malavolta, 2006), deixando-as mais susceptíveis a doenças. Em algumas frutíferas é comum a aplicação deste nutriente em grandes concentrações com o intuito de promover o aumento do peso médio. Conhecer a concentração ótima de N é importante para evitar além da má qualidade dos frutos também a poluição das águas subterrâneas (Milic et al., 2012). Neste trabalho, foi observado que além das raízes, as folhas também foram influenciadas pelas diferentes concentrações de N na solução. Em *Ananas comosus* L. cv. Vitória, o teor de N presente nas folhas também foi influenciada pela disponibilidade de N, sendo que o maior acúmulo de 12,62 g kg⁻¹ (Leonardo et al., 2013).

O teor de fósforo presente nas mudas de *A. othonianum* Rizz. foi influenciado pelas diferentes doses de N disponíveis na solução nutritiva. Este resultado está em concordância com o esperado, visto que o P, juntamente com N e K está entre os nutrientes exigidos em maiores quantidades pelas plantas (Malavolta, 2006). Além disso, o fosfato inorgânico é componente de muitas moléculas celulares, desempenhando papéis essenciais na manutenção e estrutura, bem como nos metabolismos primários e secundários (Sung et al., 2015). No entanto, sabe-se que para plantas de *A. othonianum* Rizz. os macronutrientes mais acumulados são Ca e N, enquanto o P ocupa apenas o quarto lugar na escala de acúmulo (Bessa et al., 2013). Os maiores teores de K, tanto nas folhas, quanto no caule e nas raízes foram observados na ausência de N na solução nutritiva. Com o aumento das doses de N fornecidas, foi verificada diminuição nos teores de K. A alta concentração de K na ausência de N pode ser explicada pela necessidade da planta de quantidades adequadas de K⁺ no citoplasma, visto que estas são fundamentais no metabolismo do N, principalmente nos processos de incorporação do nitrogênio mineral através do nitrato redutase (Marschner, 1995; Viana et al., 2010). Portanto, na ausência de N, como forma de incorporá-lo, as mudas aumentaram as quantidades absorvidas de K, buscando estimular o metabolismo nitrogenado. O íon potássio também possui importante papel nos metabolismos primário e secundário e ainda possui função na regulação do transporte celular (Sung et al., 2015). O K⁺ é frequentemente o íon acompanhante do NO₃⁻ que é transportado a longas distâncias via xilema até os ramos superiores (Marschner, 1995).

O maior teor de Mg nas folhas foi observado nas plantas mantidas na ausência de N na solução (0 mmol L⁻¹). De acordo com o aumento da disponibilidade de N, houve diminuição nos teores foliares de Mg. O magnésio está envolvido no metabolismo do nitrogênio por estar presente no centro da molécula de clorofila. A clorofila é composta de carbono (C) hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N) e magnésio (Mg) (Taiz e Zeiger, 2014). Em folhas e frutos de *Musa paradisíaca* L. cv. D'Angola, a adubação nitrogenada não influenciou no acúmulo de Mg, apresentando médias de 7,49; 8,19 g planta⁻¹, respectivamente (Silva et al., 2015).

Em mudas de *A. othonianum* Rizz. apenas o teor de Ca nas folhas foi influenciado pelas doses de nitrogênio. Em *Musa paradisíaca* L. cv. D'Angola, nenhum órgão da planta foi influenciado pelas diferentes concentrações de N (Silva et al., 2015). Neste trabalho, o maior teor de cálcio foi observado no caule de *A. othonianum* Rizz, isso pode ter ocorrido por causa do processo de redistribuição do cálcio no floema, visto que este é considerado um nutriente de baixa mobilidade (Malavolta, 2006).

As diferentes doses de nitrogênio na solução não influenciaram no teor de S presente nas folhas, no caule e raízes de mudas de *A. othonianum* Rizz. Esperava-se, contudo, que as diferentes concentrações de N na solução influenciassem nos teores de S nas plantas avaliadas, pois o enxofre está presente nos aminoácidos cisteína e metionina (Taiz e Zeiger, 2014), sendo também componente de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio como as redutases do nitrato e nitrito. A relação positiva entre N e S no aumento da biomassa e da produtividade de plantas já é discutido em outros trabalhos (Geng et al., 2016).

Teor de micronutrientes

Os teores dos micronutrientes como Fe, Mn, Mo, Cu e Zn nas folhas, caule e raízes de mudas de *A. othonianum* Rizz. não foram influenciados pelas doses de N presentes na solução nutritiva. Os efeitos da aplicação de nitrogênio sobre o teor de micronutrientes em espécies frutíferas ainda não é muito discutido. Porém em espécies cereais, tais como *Oryza sativa* L. a aplicação de fertilizantes nitrogenados tem mostrado aumento nos níveis de Fe, Zn, Cu e Mn nas folhas, caule e nos grãos (Hu-lin et al., 2007; Chandel et al., 2010).

O teor de B foliar foi decrescendo de acordo com o aumento das doses de N disponível para as mudas. Enquanto os teores de B no caule e nas raízes não sofreram influência das doses de N da solução nutritiva. Tal comportamento não é o esperado, pois o boro é um micronutriente que desempenha funções essenciais para o desenvolvimento vegetal e combinações de N e B podem estimular o crescimento de plantas, como ocorreu com frutos de *Carica papaya* L., em que a adubação com interação desses dois nutrientes estimulou o diâmetro e comprimento dos frutos (Brito Neto et al., 2011). Contrariamente, em plantas de *Brassica juncea* (L.) Czern, a aplicação de nitrogênio promoveu aumento na biomassa, mas não afetou a absorção de boro (Giansoldati et al., 2012).

Teor de macronutriente na quarta folha

Um dos critérios utilizados para avaliar o estado nutricional das plantas se baseia em análises químicas feitas nas folhas secas, geralmente na quarta folha completamente desenvolvida, contata a partir do ápice (Moreira et al., 2011). A quarta folha representa a folha completamente expandida, não sendo fonte e nem dreno nas plantas em fase inicial de desenvolvimento e por isso pode ser usada para representar o teor nutricional. Em mudas de *A. othonianum* Rizz. o teor de nitrogênio na quarta folha aumentou de acordo com o aumento da dose de N, atingindo o valor máximo na dose de 14,2 mmol L⁻¹. A absorção de N ocorre diretamente pelas raízes, sendo então, transportado para a parte aérea através do xilema (Malavolta, 2006). Por isso os sintomas visuais de deficiência deste nutriente são percebidos inicialmente nas folhas mais velhas (Epstein e Bloom, 2006). A aplicação de doses de N em *Morus nigra* L. apresentou correlação positiva nos tecidos para os teores de nitrogênio (Picolotto et al., 2015). Porém a correlação do N com produtividade também está relacionada com o fenômeno de consumo de luxo, que resulta em concentração de N bem acima dos teores necessários para estimular o aumento na produtividade (Coelho et al., 2012).

O teor de fósforo na quarta folha foi influenciado pelas doses de N. O P juntamente com N está entre os nutrientes mais exigidos pelas plantas. Isso ocorre, pois a presença de P é indispensável para o crescimento e produção vegetal e ainda interfere em processos da fotossíntese e respiração, armazenamento e transferência de energia (Malavolta, 2006). Harpole et al. (2011) sugerem que para se obter a resposta de crescimento vegetal é necessário a adição simultânea de N e P. Adições

individuais destes nutrientes provocam respostas independentes. Na quarta folha de mudas de *A. othonianum* Rizz, verificou-se que na ausência de N da solução, foi estimado o maior teor de P. Aumentando o N externo, aumenta a concentração de N na planta, porém a concentração de P na planta diminui (Agren et al., 2012).

Na quarta folhas, o teor de potássio também variou em função das doses de nitrogênio na solução nutritiva. Este nutriente é importante no metabolismo do nitrogênio, sendo altamente móvel na planta, com importante papel no estado energético e na manutenção da água nos tecidos vegetais (Marschner, 1995). Em folha “D” de abacaxi, o aumento das doses de N disponível proporcionou decréscimo dos teores foliares de K antes e após a indução floral (Marques et al., 2013).

Neste trabalho, à medida que foi aumentada a dose de nitrogênio na solução, foi estimada a diminuição no teor de Ca na quarta folha. Fato semelhante também foi verificado com os teores foliares avaliados na planta. Isso demonstra possível correlação negativa entre os teores foliares de N e Ca em *A. othonianum* Rizz. causada provavelmente pela mobilidade do Ca, este nutriente é considerado relativamente imóvel no floema (Taiz e Zeiger, 2014) não conseguindo se redistribuir com facilidade pela planta. Garrone et al. (2016) também verificaram em plantas de *Jatropha curcas* L., que os valores de Ca também variaram em função do suprimento de N e que a deficiência de Ca é agravada com o aumento da disponibilidade de N nas plantas. O cálcio é fundamental para permeabilidade das membranas e manutenção da integridade celular, sendo exigido na divisão e expansão celular (Malavolta, 2006).

Teor de micronutrientes na quarta folha

Estudos sobre o efeito da adubação nitrogenada na absorção de micronutrientes são raros, porém algumas pesquisas mostram que o uso de fertilizantes nitrogenados pode afetar a concentração de micronutrientes nas plantas e nos grãos (Shi et al., 2010). Apesar dos micronutrientes serem requeridos em quantidades menores, eles são tão importantes quanto os macronutrientes para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Malavolta, 2006). Neste trabalho os teores de Zn e Mn sofreram influência das diferentes doses de N disponíveis para mudas de *A. othonianum* Rizz. Em plantas de *Pisum sativum* L. cultivar Utrillo, a combinação entre doses de zinco e nitrogênio (6 kg ha⁻¹ de Zn + 120 kg ha⁻¹ de N) proporcionou melhor qualidade química e nutricional dos

grãos (Cardoso et al., 2012). O manganês é essencial no metabolismo do nitrogênio, pois ele é constituinte da enzima nitrito redutase (Benett et al., 2013).

Enzimas do metabolismo do nitrogênio e óxido nítrico

No presente estudo, as atividades das enzimas do metabolismo do nitrogênio, como a GS e NR foram influenciadas pelas diferentes doses de N em solução nutritiva para mudas de *A. othonianum* Rizz. Nas plantas mantidas na ausência de N, foi detectada atividade dessas enzimas, mesmo que baixa. A ação destas enzimas não era esperada sob esta condição, visto que não houve suprimento de nitrogênio. Contudo, NR poderia estar atuando sobre nitrato proveniente do catabolismo de aminoácidos. Da mesma forma, GS poderia estar agindo sobre glutamato advindo da degradação de proteínas. Trabalhos têm evidenciado que em situação de estresse salino e hídrico, as atividades de GS tendem a aumentar em virtude de incrementos na atividade de proteases e no catabolismo de aminoácidos (Berteli et al., 1995). Esse efeito já foi evidenciado em plantas de *A. occidentale* sob condições de estresse salino por Viégas et al. (2004).

Nas plantas submetidas à dose de 2,5 mmol L⁻¹ de N tanto para GS quanto para NR foram observadas as maiores atividades destas enzimas sinalizando que o fornecimento inicial de N na solução, em baixas concentrações, pode ter sido o suficiente para estimular os processos de redução do N a nitrito e a condensação de glutamato em amônia. O NO₃⁻ é a principal fonte inorgânica de N absorvida por plantas superiores e a redução deste a NO₂⁻ é catalizada pela NR, a GS, no entanto, é responsável pela reciclagem de N, assimilando o amônio liberado por vários processos metabólicos da planta (Silva et al., 2015). Estudos têm demonstrado que o nitrato funciona como uma molécula sinalizadora na expressão dos genes da NR e o fornecimento de nitrato em plantas cultivadas na ausência de N estimulam a indução da expressão da NR (Crawford, 1995; Yanagisawa, 2014). Assim, enzimas como NR e GS são essenciais nos processos de assimilação e no metabolismo do nitrogênio, conforme mostra a figura 7. O metabolismo nitrogenado corresponde a uma rede complexa de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e outras substâncias químicas (Sung et al., 2015). Em plantas de *Oryza sativa* L. transgênico, modificadas para a super-expressão de GS, foi verificada alteração em todo perfil metabólico (açúcares individuais, ácidos orgânicos e aminoácidos livres) da planta (Bao et al., 2014). Outro estudo para mesma

espécie de *Oryza sativa* L. transgênico cultivado em baixas concentrações de N mostrou diminuição na síntese de aminoácidos (Cai et al., 2009).

Plantas de *A. othonianum* Rizz. cultivadas na ausência de N (0 mmol L⁻¹) obtiveram o maior teor de ON. É possível que a ausência de N na solução nutritiva tenha estimulado a ativação de rotas metabólicas relacionadas ao estresse, elevando a síntese de ON. O óxido nítrico é considerado um mensageiro biológico, que desempenha papel importante na regulação de vários processos fisiológicos em plantas, incluindo crescimento, desenvolvimento e resposta a fatores de estresse biótico e abiótico (Jhanji et al., 2012; Khairy et al., 2016). Contrariamente, nas plantas submetidas a maior dose 15 mmol L⁻¹ de N foi observada a menor síntese de ON, indicando que em plantas de *A. othonianum* Rizz., altas concentrações de N não induzem a produção de espécies reativas de nitrogênio, como o ON, sendo possível que outras rotas de estresse sejam ativadas em situação de toxidez por alta concentração de N. Esta molécula de sinalização é de extrema importância, sendo sintetizada frente a vários estresses, incluindo exposições a metais pesados, deficiência ou toxicidade de algum elemento. ON atua nas respostas ao estresse podendo auxiliar em ganhos na produção. Porém, em frutos de *Lycopersicon esculentum* cv. submetidos à toxicidade por boro, a aplicação exógena de ON promoveu aumento na colheita dos frutos (Kaya et al., 2015).

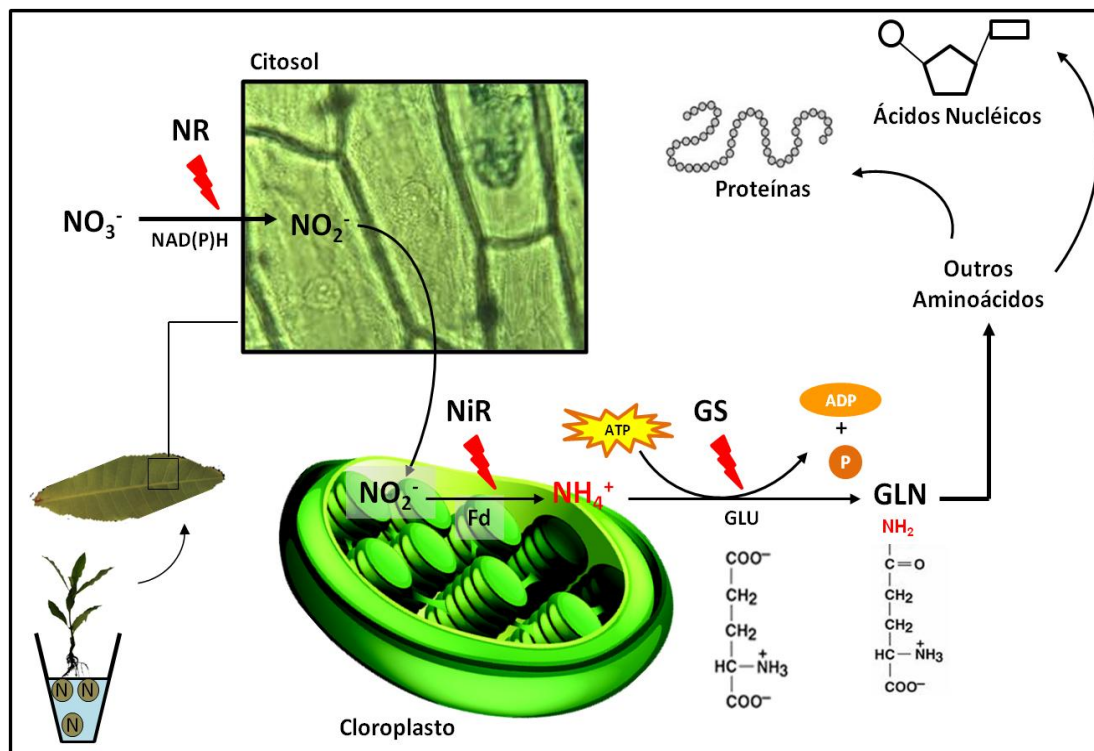


Figura 7. Representação da assimilação do nitrato em folhas de *Anacardium othonianum* Rizz. As raízes absorvem o nitrato (NO_3^-) da solução, que chega através de transportadores ao citosol da célula vegetal. O NO_3^- é reduzido a nitrito (NO_2^-), pela ação da enzima nitrato redutase (NR) que utiliza NAD(P)H como doador de elétrons. O nitrito é rapidamente transportado para estroma do cloroplasto. Utilizando a energia fornecida por seis ferredoxinas (Fd) a nitrato redutase (NiR) converte o nitrito em amônio (NH_4^+). Este se combina com glutamato (GLU) para formar glutamina (GLN), utilizando a energia da hidrólise de um ATP e a ação da glutamina sintetase (GS). A partir da glutamina acontece a formação de outros aminoácidos podendo estes serem utilizados na estrutura de proteínas e ácidos nucleicos (Adaptado de Epstein e Bloom, 2006).

Conclusão

Houve sintomas de excesso de N como redução no número de folhas e áreas foliares da planta e quarta folha. O número máximo de folhas foi obtido na dose $10,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de N. Doses de N influenciaram negativamente os teores, na quarta folha, de fósforo, potássio, cálcio e manganês, influenciaram positivamente o teor de nitrogênio na quarta folha e não interferiram nos teores de ferro e cobre na quarta folha. O teor ótimo de N na quarta folha foi de $2,78 \text{ g Kg}^{-1}$, na dose de $14,2 \text{ mmol L}^{-1}$. A dose de $2,5$

mmol L⁻¹ de N induziu a atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase, enquanto a ausência de nitrogênio aumentou a síntese do óxido nítrico em mudas de *A. othoniaum* Rizz.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPEG (Fundação de amparo à pesquisa do Estado de Goiás), pela concessão da bolsa de doutorado, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de pós-doutorado e apoio financeiro e à CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelos suportes financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências Bibliográficas

Agren, G.I.; Wetterstedt, J.A.; Billberger, M.F.K. Nutrient limitation on terrestrial plant growth – modeling the interaction between nitrogen and phosphorus. *New Phytologist*. v. 194, p.953-960, 2012.

Antoniou, C.; Filippou, P.; Mylona, P.; Fasoula, D.; Ioannides, I.; Polidoros, A.; Fotopoulos, V. Developmental stage- and concentration-specific sodium nitroprusside application results in nitrate reductase regulation and the modification of nitrate metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Plant Signaling & Behavior*. v. 8, n.9, p. 25479-1 – 25479-10, 2013.

Ata-Ul-Karim, S.T.; Zhy, Y.; Yao, X.; Cao, W. Determination of critical nitrogen dilution curve based on leaf area index in Rice. *Field Crops Research*. v. 167, p. 76-85, 2014.

Bao, A.; Zhao, Z.; Ding, G.; Shi, L.; Xu, F.; Cai, H. Accumulated Expression Level of Cytosolic Glutamine Synthetase 1Gene (OsGS1;1 or OsGS1;2) Alter Plant Development and the Carbon-Nitrogen Metabolic Status in Rice. *Plos one*. v. 9, n. 4, p. 95581. 1-14, 2014.

Benett, C.G.S.; Buzetti, S.; Benett, K.S.S.; Teixeira Filho, M.C.M.; Costa, N.R.C.; Maeda, A.S.; Andreotti, M. Acúmulo de nutrientes no colmo de cana-de-açúcar em

função de fontes e doses de manganês. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 34, n. 3, p. 1077-1088, 2013.

Berteli, F.; Corrales, E.; Guerrero, C.; Ariza, M.J.; Pilego, F.; Valpuesta, C. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v. 93, p. 259- 264, 1995.

Bessa, L.A.; Silva, F.G.; Moreira, M.A.; Teodoro, J.P.R.; Soares, F.A.L. Growth and nutrient accumulation of *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown in nutrient solution. *Chilean journal of agricultural research*. v. 73, n. 3, p. 301-308, 2013.

Brito Neto, J.F.; Pereira W.E.; Cavalcanti, L.F.; Araújo, R.C.; Lacerda, J.S. Produtividade e qualidade de frutos de mamoeiro ‘Sunrise Solo’ em função de doses de nitrogênio e boro. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, p.69-80. 2011.

Caetano, L.; Ventura, J.A.; Costa, A.F.S.; Guarçoni, R.C. Efeito da adubação com nitrogênio, fósforo e potássio no desenvolvimento, na produção e na qualidade de frutos do abacaxi ‘vitória’. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 35, n. 3, p. 883-890. 2013.

Cai, H.; Zhou, Y.; Xiao, J.; Li, X.; Zhang, Q.; Lian, X. Overexpressed *glutamine synthetase* gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. *Plant Cell Reports*. v.28, p. 527–537. 2009.

Cardoso, E.D.; Haga, K.I.; Binotti, F.F.; Valério Filho, W.V.; Nogueira, D.C. Doses de zinco e nitrogênio na produtividade e qualidade de grãos de ervilha. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. v. 42, n. 3, p. 263-271, 2012.

Chandel, G.; Banderjee, S.; See, S.; Meena, R.; Sharma, D.J.; Verulkar, S.B. Effects of Different Nitrogen Fertilizer Levels and Native Soil Properties on Rice Grain Fe, Zn and Protein Contents. *Rice Science*. v. 17, n. 3, p. 213-277, 2010.

Chrysargyris, A.; Panayiotou, C.; Tzortzakis, N. Nitrogen and phosphorus levels affected plant growth, essential oil composition and antioxidant status of lavender plant (*Lavandula angustifolia* Mill.) *Industrial Crops and Products*, v. 83, p. 577-586, 2016.

Ciriello, V.; Guerrini, I.A.; Backes, C. Doses de nitrogênio no crescimento inicial e nutrição de plantas de guanandi. *Cerne*. v. 20, n. 4, p. 653-660, 2014.

Coelho, F.S.; Fontes, P.C.R.; Finger, F.L.; Cecon, P.R. Avaliação do estado nutricional do nitrogênio em batateira por meio de polifenóis e clorofila na folha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 4, p. 584-592, 2012.

Crawford, N.M. Nitrate nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*. v. 7, pp. 859-868, 1995.

Dias, M.J.T.; Souza, H.A.; Natale, W.; Modesto, V.; Rozane, D.E. Adubação com nitrogênio e potássio em mudas de goiabeira em viveiro comercial. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 33, n. 1, p. 2837-2842, 2012.

Epstein, E.; Bloom, A.J. *Nutrição mineral de plantas, princípios e perspectivas*. 2ª. Ed Londrina, Editora Planta 403 p. 2006.

Ferreira, D.F. *SISVAR - Sistema de análise de variância*. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA. 2010.

Ferreira, T.; Rasband, W. *O ImageJ Guia do Usuário-Version 1,43*. 2010. Disponível em:<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf> (acessado em março 2016).

Garrone, R.F.; Campos, A.G.; Silveira, C.P.; Lavres Junior, J. Produção de biomassa, diagnose nutricional e absorção de nitrogênio e cálcio durante crescimento inicial do pinhão-mansão. *Revista Ciência Agronômica*. v. 47, n. 1, p.22-31, 2016.

Geng, J.; Ma, Q.; Chen, J.; Zhang, M.; Li, C.; Yang, Y.; Yang, X.; Zhang, W.; Liu, Z. Effects of polymer coated urea and sulfur fertilization on yield, nitrogen use efficiency and leaf senescence of cotton. *Field Crops Research*. v. 187, p. 87-95, 2016.

Giansoldati, V.; Tassi, E.; Morelli, E.; Gabellieri, Edi.; Pedron, F.; Barbaferi, M. Nitrogen fertilizer improves boron phytoextraction by *Brassica juncea* grown in

contaminated sediments and alleviates plant stress. *Chemosphere*. v. 87, p. 1119-1125, 2012.

Harpole, S.; Ngai, J.T.; Cleland, E.E.; Seabloom, E.W.; Borer, E.T.; Bracken, M.E.S.; Elser, J.J.; Gruner, D.S.; Hillebrand, H.; Shurin, J.B. Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters*. v. 14, p. 852-862, 2011.

Hoagland, D.; Arnon, D.I. The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station Circular 347. College of Agriculture, University of California, Davis, California, USA. 1950.

Hu-lin, H.; You-zhang, W.; Xiao-e, Y.; Ying, F.; Chun-young, W. Effects of Different Nitrogen Fertilizer Levels on Fe, Mn, Cu and Zn Concentrations in Shoot and Grain Quality in Rice (*Oryza sativa*). *Rice Science*. v. 14, n. 4, p. 289-294, 2007.

Jhanji, S.; Setia, R.C.; Kaur, N. Role of nitric oxide in cadmium-induced stress on growth, photosynthetic components and yield of *Brassica napus* L. *Journal of Environmental Biology*.v. 33, p. 1027-1032, 2012.

Kaya, C.; Ashraf, M. Exogenous application of nitric oxide promotes growth and oxidative defense system in highly boron stressed tomato plants bearing fruit. *Scientia Horticulturae*. v. 185, p. 43-47, 2015.

Khairy, A.I.H.; Oh, M.J.; Lee, S.M.; Kim, D.S.; Roh, K.S. Nitric oxide overcomes Cd and Cu toxicity in in vitro-grown tobacco plants Q1 through increasing contents and activities of rubisco and rubisco activase. *Biochimie Open*. p. 1-11, 2016.

Leonardo, F.A.P.; Pereira, W.E.; Silva, S.M.; Costas, J.P. Teor de clorofila e índice spad no abacaxizeiro cv. vitória em função da adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 35, n. 2, p. 377-383, 2013.

Malavolta, E. Manual de Nutrição Mineral de Plantas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 630 p.

Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, A.S. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: Potafós. 1997. 319 p.

Marques, L.S.; Andreotti, M.; Buzetti, S.; Teixeira Filho, M.C.M.; Garcia, C.M.P. Análise química da folha “d” de abacaxizeiro cv. smooth cayenne antes e após a indução floral em função de doses e parcelamentos de nitrogênio. Bioscience Journal. v. 29, n. 1, p. 41-50, 2013.

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

Martins, R.N.; Nóbrega, R.S.A.; Silva, A.F.T.; Nóbrega, J.C.A.; Amaral, F.H.C.; Costa, E.M.; Lustosa Filho, J.F.; Martins, L.V. Nitrogênio e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi inoculado. Semina: Ciências Agrárias, v. 34, n. 4, p. 1577- 1586, 2013.

Mattos Junior, D.; Ramos, U.M.; Quanggio, J.A.; Furlani, P.R. Nitrogênio e cobre na produção de mudas de citros em diferentes porta-enxertos. Bragantia. v. 69, n. 1, p. 135-147, 2010.

McAllister, C.H.; Beatty, P.H.; Good. A.G. Engineering nitrogen use efficient crop plants; the current status. Plant Biotechnology Journal. v. 10, n. 11, p. 1467-7652, 2012.

Meena, S.k.; Rakshit, A.; Meena, V.S. Effect of seed bio-priming and N doses under varied soil type on nitrogen use efficiency (NUE) of wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. v. 6, p. 68-75, 2016.

Milic, B.; Cabilovski, R.; Keserovi, Z.; Manojlovic, M.; Magazin, N.; Doric, M. Nitrogen fertilization and chemical thinning with 6-benzyladenine affect fruit set and quality of golden delicious apples. Scientia Horticulturae. v. 140, p. 81-86, 2012.

Moreira, M.A.; Fontes, P.C.R.; Cecon, P.R.; Araújo, R.F. Índices para avaliar o estado de nitrogênio da batata multiplicada por distintos materiais propagativos. *Revista Ceres*, v. 58, n. 3, p. 384-392, 2011.

Orsel, M.; Moison, M.; Clouet, V.; Thomas, J.; Leprince, F.; Canoy, A. S.; Just, J.; Chalhoub, B.; Masclaux-Daubresse, C. Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*. v 65, n. 14, p. 3927-3947, 2014.

Picolotto, L.; Vignolo, G.K.; Pereira, I.S.; Gonçalves, M.A.; Antunes, L.E.C. Enraizamento de estacas de amoreira-preta em função da adubação nitrogenada na planta matriz. *Cerne*. v. 62, n. 3, p. 294-300, 2015.

Qiao, W.; Fan, L.M. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*. v. 50, n. 10, p. 1238-1246, 2008.

Radin, J. W. Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. *Plant Physiology*, v.53, p.458-463, 1974.

Rosales, E.P.; Iannone, M.F.; Groppa, M.D.; Benavides, M.P. Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: involvement of nitric oxide. *Amino Acids*. v. 42, p. 857-865, 2012.

Rhodes, D.; Stewart, G.R. A procedure for the *in vivo* determination of enzyme activity in higher plant tissue. *Planta*. v. 118, p. 133-144, 1974.

Souza, J.A.; Canezin, R.C.F.S.; Buzetti, S. Mobilidade de boro em mudas de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 3, p. 930-935, 2012.

Shi, R.; Zhang, Y.; Chen, X.; Dom, Q.; Zhang, F.; Romheld, V.; Zou, C. Influence of long-term nitrogen fertilization on micronutrient density in grain of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) *Journal of Cereal Science*. v. 51, p. 165-170, 2010.

Silva, A.C.P.; Borges, A.L.; Coelho, E.F. Acúmulo de nutrientes em bananeira ‘d’angola’ (tipo terra) sob doses de nitrogênio via água de irrigação. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 37, n. 2, p. 488-496, 2015.

Silva, L.S.; Seabra, A.R.; Leitão, J.N.; Carvalho, H.G. Possible role of glutamine synthetase of the prokaryotic type (GSI-like) in nitrogen signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Science*. v. 240, p. 98-108, 2015.

Sung, J.; Lee, S.; Lee, Y.; Ha, S.; Song, B.; Kimc, T.; Waters, B.; Krishnane, H. Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Science*. v. 214, p. 55-64, 2015.

Taiz L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

Thomsen, H.C.; Eriksson, D.; Møller, I.S.; Schjoerring, J.K. Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency? *Trends in Plant Science*. v. 19, n. 10, p. 656-663, 2014.

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

Viégas, R. A.; Silveira, J. A. G.; Silva, L. M. M.; Viégas, P. R. A.; Queiroz, J. E.; Rocha, I. M. A. Redução assimilatória de NO_3^- em plantas de cajueiros cultivados em meio salinizado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v. 8, n. 2/3, p. 189-195, 2004.

Yanagisawa, S. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Science*. v. 229, p. 167-171, 2014.

Yu, X.; Wang, B.; Zhang, C.; Xu, W.; He, J.; Zhu, L.; Wang, S. Effect of root restriction on nitrogen levels and glutamine synthetase activity in ‘Kyoho’ grapevines. *Scientia Horticulturae* v. 137, p. 156–163, 2012.

Zhou, B.; Guo, Z.; Xing, J.; Huang, B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany*. v. 56, p. 3223–3228, 2005.

CONCLUSÃO GERAL

A adubação nitrogenada em solução nutritiva influenciou a produção de mudas de cajue-
de-árvore-do-cerrado (*A. othonianum* Rizz).

As características morfoanatômicas foliares bem como a produção de compostos
fenólicos, carboidratos, alcaloides, teor de clorofila e densidade estomática foram
afetadas pelas doses de nitrogênio fornecidas a mudas de *A. othonianum* Rizz. em
solução nutritiva.

A adubação nitrogenada foi fundamental para a estruturação tecidual foliar em mudas
de *A. othonianum* Rizz. cultivadas em sistema hidropônico.

O número máximo de folhas foi obtido na dose 10,7 mmol L⁻¹ de N.

A dose de N não influenciou os teores de Fe e Cu na quarta folha. A dose de 2,5 mmol
L⁻¹ de N induziu a atividade das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase,
enquanto a ausência de nitrogênio aumentou a síntese do óxido nítrico em mudas de *A.*
othoniaum Rizz.