

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Departamento de Produção Vegetal

Nutrição da soja com níquel e redistribuição do nitrogênio na senescência

João Leonardo Corte Baptistella

Piracicaba
2016

João Leonardo Corte Baptistella

Graduando em Engenharia Agrônômica – Esalq/USP

Número USP: 7607423

Nutrição da soja com níquel e redistribuição do nitrogênio na senescência

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito para
obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.

Orientador: José Laércio Favarin

Piracicaba

2016

Dedico à minha família e meus amigos,
pelo apoio e pela compreensão
no decorrer dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela bela vida que levo.

À minha família, pela educação e formação que me deram. E por estar sempre presente.

À Gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP pelos ensinamentos, histórias e amigos que levarei por toda a vida. A saudade já bate fundo no peito. “*Não há quem possa, com a turma nossa.*”

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e aos seus assessores, pelo apoio financeiro do processo de bolsa de iniciação científica (2014/13729-1).

Ao Sauipe pelas discussões para o desenvolvimento do projeto, revisão de meus textos e nortear as análises laboratoriais.

Ao meu orientador José Laércio Favarin pela oportunidade de participar do grupo de estágio e confiança.

Aos amigos Kaskata, Ganta, Lasko, Prego e Boia, que colaboraram de alguma forma para a realização desse projeto, seja com dicas, revisões ou críticas. Além é claro das boas histórias, risadas e viagens. Foram tempos muito bons de ENUSP.

Ao Palãq pela parceria e irmandade durante os anos de faculdade e os mais de quinze anos antes disso.

Aos amigos e companheiros de labuta Palãq, Muié, Pititosu, Lixo e Fréxi, pela camaradagem, ajuda no experimento e pelas muitas risadas.

Ao pessoal do laboratório, Edson 50X pela ajuda nas análises de laboratório e *per le parole in italiano*; e ao Netão pelas conversas diárias sobre futebol e por possibilitar que assistisse todos os jogos do Palmeiras, apesar de ser torcedor do nosso maior rival. Mesmo sem parecer, foi tudo de grande valia.

Aqueles que não foram mencionados, não chorem. Às vezes a mente prega peças e nos foge à lembrança quem não deveria de lá sair.

“A barriga se sacia rápido, o espírito não se sacia nunca. ”
(Francisco Sánchez Gómez “Paco de Lucía”)

RESUMO

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela soja, devido ao alto teor de proteína nas sementes. Durante o período de enchimento de grãos, a redistribuição interna na planta contribui com parte da demanda por esse nutriente. Nesse processo, o N armazenado nos tecidos vegetativos é degradado e libera ureia, a qual precisa sofrer ação da enzima urease para ser posteriormente assimilada aos grãos. O níquel (Ni) é o micronutriente responsável pela ativação da enzima urease e também altera o metabolismo do N. O presente estudo avaliou o efeito do fornecimento de três doses de Ni (0, 5 e 25 ppm), em dois níveis de disponibilidade de N (normal e adicional), sobre a cultura da soja. O estudo foi conduzido em Piracicaba-SP, com aplicações parceladas de Ni e N em vasos. O fornecimento de Ni ocasionou aumento da concentração do mesmo nas folhas, bem como queda de produção de grãos e matéria seca de soja. Aumentou-se em mais de três vezes a atividade da enzima urease, independentemente da disponibilidade de N no sistema. Embora haja redução no acúmulo de N nos grãos, em condições normais encontradas a campo, a adição de Ni à soja foi capaz de aumentar em cerca de três vezes a contribuição do N advindo do processo de redistribuição no total de N acumulado nos mesmos, além de contribuir para melhor eficiência de uso do N absorvido, que em condições normais elevou-se de 10 a 99% com a adição do micronutriente.

PALAVRA-CHAVE: níquel, ureia, urease, nitrogênio, redistribuição, eficiência de uso do nitrogênio, enchimento de grãos, soja.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is the most required nutrient by soybean, due its seed's high protein level. During seed filling period, plant's internal reallocation contributes with part of this nutrient demand. In this process, N stored in the vegetative tissues, is degraded releasing urea, which must have urease enzyme action to be assimilated to the grains afterwards. Nickel (Ni) is the micronutrient responsible for urease activation and modification on N metabolism. This study evaluated the effects of three doses of Ni fertilization (0, 5 and 25 ppm) on soybean culture under two levels of N availability (normal and additional). The research was conducted in Piracicaba-SP with split provision of Ni and N in vases. Addition of Ni led to elevation on its concentration on leaves, as well as decay of grain production and plant dried matter. It enhanced by three-fold urease enzyme activity, independent of N availability. Even though N accumulation on grains was lower, in normal field conditions, Ni fertilization increased by three times the contribution of N from the redistribution process to the total amount of N in the grains, leading to better use of absorbed N, that in normal conditions, was enhanced from 10 to 99% with Ni addition.

KEY-WORDS: nickel, urea, urease, nitrogen, redistribution, nitrogen use efficiency, seed fill, soybean.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	9
2. Objetivos.....	10
3. Material e Métodos	10
3.1 Modelo Experimental	10
3.2 Instalação e Condução do Experimento	11
3.3 Coleta de Plantas	13
3.4 Extração e Determinação da Atividade da Enzima Urease	13
3.5 Preparo e Secagem de Amostras	14
3.6 Determinação das Concentrações de Nutrientes	14
3.7 Índices de Eficiência de Uso do Nitrogênio (IEUN)	14
3.8 Redistribuição do Nitrogênio	14
3.9 Formas de Análises de Resultados	14
4. Resultados e Discussão	15
4.1 Matéria Seca	15
4.2 Extração e Atividade da Enzima Urease	17
4.3 Teor total de N	19
4.4 Análise das concentrações de Nutrientes	23
4.5 Redistribuição de Nitrogênio	25
4.6 Índices de Eficiência de Uso do N (IEUN)	27
5. Conclusões	29
6. Referências Bibliográficas	30

1. Introdução

O nitrogênio (N) é o nutriente exigido em maior quantidade pelos vegetais. A cultura da soja em especial, demanda grande quantidade de N devido ao alto teor de proteína em suas sementes (Osaki et al.; 1991). O N presente na semente pode vir diretamente da fixação biológica de N, do solo ou da redistribuição interna da planta (Zhao et al., 2014).

A redistribuição é o processo pelo qual o nitrogênio armazenado nos tecidos vegetativos é mobilizado aos tecidos dreno (Witte, 2011). Ela é importante na fase de enchimento de grãos (Zhao et al., 2014), visto que aproximadamente 50% do N nos grãos de soja provém da redistribuição (Hanway, Weber, 1971). Na soja, o N é armazenado em hastes, folhas e pecíolos (Zhao et. al., 2014) e remobilizado às sementes durante período de enchimento de grãos. Esse período inicia-se no estágio R5, início do enchimento de grãos, e vai até o início da maturidade fisiológica da planta, R7.

A arginina é o principal aminoácido de reserva de N nos tecidos vegetativos das plantas e nas sementes (Rennenberg et al., 2010; Ninomiya et al., 2004; Van Etten et al., 1967). O catabolismo da arginina, pela atividade da arginase, libera metade do nitrogênio na forma de ureia, a qual, por ação da enzima urease é degradada em amônia e gás carbônico (Witte, 2011).

Somente por ação da enzima urease o N proveniente da ureia se torna disponível à assimilação pela planta (Gerendás et al., 1999). A falta da enzima leva ao acúmulo de ureia, cuja toxidez provoca lesões necróticas nas folhas (Eskew et al., 1983, 1984; Walker et al., 1985). Em sementes velhas de *Arabidopsis* com urease quimicamente inibida, a germinação ocorreu apenas com adição externa de N (Zonia et al., 1995). Para a soja, a urease é encontrada em todos os tecidos vegetais, mesmo que em pequena quantidade. Essa enzima é importante para a reciclagem do N proveniente da arginina (Witte, 2011).

A única enzima das plantas a conter níquel (Ni) é a urease, sendo o metal seu ativador (Dixon et al., 1975), razão pela qual o Ni é essencial às plantas superiores (Marschner, 1995). Sob deficiência de Ni há acúmulo ureia, que causa necrose foliar (Eskew et al., 1983, 1984; Walker et al., 1985; Kutman et al., 2013). Em soja deficiente

em Ni, a atividade da urease reduziu 99% nas sementes e até 50% nas folhas (Kutman et al., 2012).

A fase de enchimento de grãos depende do N proveniente do catabolismo da arginina. Cevada cultivada sem Ni ou com doses muito baixas produziu sementes inviáveis, problema sanado quando as plantas mãe foram suplementadas com Ni (Brown et al., 1987). Em experimento para aumentar o teor de Ni nas sementes de soja, ocorreram aumentos de até 6,2 sacas de por hectare (Moraes et al., 2010). Entretanto, não existem recomendações oficiais para o manejo de Ni nas culturas.

Estudos indicam os efeitos do Ni em aumentar a atividade de urease e melhorar a eficiência de uso do N (Gerendas e Sattelmacher, 1999; Gerendas et al., 1999). Contudo, tem-se pouco conhecimento a respeito dos efeitos do Ni no metabolismo de nitrogênio, tampouco existem referências quanto à dose desse micronutriente a ser utilizada na cultura da soja. Espera-se que o fornecimento de Ni aumente a degradação da ureia, acelerando o processo de redistribuição de N na planta, o que contribuiria para melhor enchimento de grãos e eficiência de uso do N.

2. Objetivo

Frente ao exposto, pretende-se estudar as consequências do fornecimento de Ni à soja. Caracterizar as respostas fisiológicas e bioquímicas da planta, além de compreender os efeitos do micronutriente sobre a redistribuição de N durante enchimento de grãos. Espera-se estabelecer se é recomendável a aplicação de Ni à cultura.

3. Material e Métodos

3.1 Modelo Experimental

Realizou-se o experimento em casa de vegetação do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP), em Piracicaba – SP. Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) da cultivar BMX Turbo, semeadas em vasos de 5 dm⁻³ com substrato orgânico. Como exemplificado a seguir, os tratamentos constituíram-se de três doses de Ni e dois níveis de adubação nitrogenada, formando delineamento experimental fatorial com seis tratamentos (Doses de Ni X Doses de N) em blocos ao acaso, com quatro repetições.

3.2 Instalação e Condução do Experimento

A soja foi semeada em 30 de novembro de 2014. Foram realizadas três tentativas anteriores, mas houve problemas com a germinação. Então, os vasos, bem como o substrato foram trocados e se obteve sucesso na data citada. Semeou-se dez sementes por vaso e após germinação e emergência realizou-se o desbaste para que restassem apenas quatro plantas por vaso (Figura 1).



Figura 1. Vista geral do experimento após desbaste.

Na tabela 1 estão dispostos os tratamentos de dose de Ni e N. As plantas foram submetidas ao Ni nas concentrações de 0, 5 e 25 ppm. As doses foram divididas em quatro aplicações, de modo que ao final, toda a dose referente ao tratamento fosse aplicada até o estágio V3. Utilizou-se cloreto de níquel como fonte desse micronutriente.

Para o fornecimento de N utilizou-se nitrato de amônio (NH_4NO_3). Todo o N requerido para que a soja desenvolvesse o seu ciclo foi fornecido em todos os tratamentos, de forma parcelada, até o estágio R1 (início do florescimento), totalizando 8 g vaso^{-1} (adubação nitrogenada normal), evitando assim, que ocorresse limitação ao desenvolvimento das plantas. A partir de R1, metade dos tratamentos (T1, T3 e T5) recebeu quantidade adicional de N correspondente a 30% da dose aplicada anteriormente (adubação nitrogenada adicional). Ressalta-se que, nesse caso, a quantidade de N oferta às plantas é além da necessária para o cumprimento de seu ciclo, em outras palavras, há excesso de N no sistema. Este tratamento foi

proposto para visualizar o efeito do Ni especificamente na redistribuição de N, conforme exemplificado na figura 2.

Os demais nutrientes foram fornecidos nas seguintes doses (mg dm^{-3}): P – 60; K – 50; S – 50; B – 1; Co – 0,1; Cu – 1; Mn – 5; Mo – 0,15 e Zn – 5. Durante a condução do experimento realizou-se o controle de pragas e doenças quando necessário, de acordo com as práticas de manejo recomendada para a cultura da soja.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados no projeto

Tratamento	Dose de Ni (ppm)	Dose de N (g/vaso)	
		Até R1	Após R1
T1	0	8	2,4
T2	0	8	0
T3	5	8	2,4
T4	5	8	0
T5	25	8	2,4
T6	25	8	0

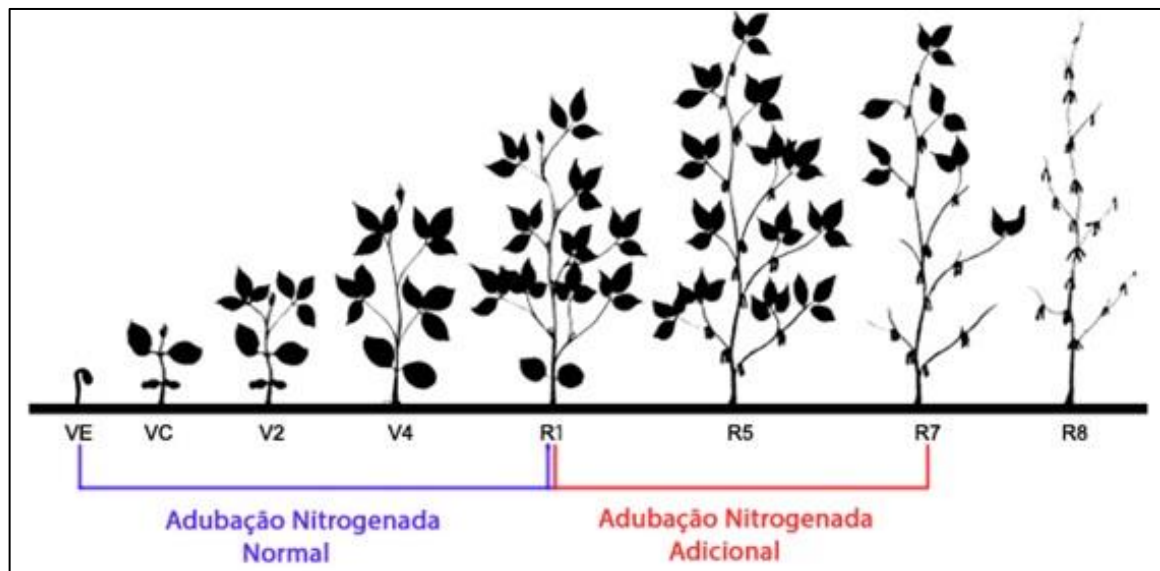


Figura 2. Esquema da aplicação de N durante o ciclo da soja, exemplificando as épocas das diferentes formas de adubação nitrogenada.

3.3 Coleta de Plantas

Metade das parcelas destinaram-se à primeira coleta de plantas, realizada quando atingiram o estágio fenológico R5 (início do enchimento de grãos), na data de 16 de janeiro de 2015. A outra metade à segunda coleta de plantas, que foi realizada quando no estágio fenológico de R7 (maturidade fisiológica), na data de 18 de fevereiro de 2015, finalizando a parte de “campo” do experimento. Foram coletadas todas as plantas de cada parcela, cortando-se abaixo do nó cotiledonar (Figura 3B). O material de cada coleta foi então acondicionado em sacos de papel, devidamente identificado e levado ao laboratório para realização das avaliações pertinentes.

3.4 Extração e Determinação de Atividade da Enzima Urease

Como proposto, avaliou-se a atividade da enzima urease, segundo Wiitte e Medina-Escobar (2001), coletando-se material foliar fresco em R5 para a avaliação (Figura 3A). Utilizou-se amostra de 0,1 g material vegetal macerado em 0,5 mL tampão 50 mM fosfato (pH 7.5) contendo 1,5% PVPP, 50 mM NaCl, e 1 mM EDTA. Imediatamente após a extração, DTT e PMSF foram adicionados na concentração final de 20 e 0,1 mM respectivamente. Após extração, centrifugou-se o extrato a 14,000 x g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente nas mesmas condições por 20 minutos. Adicionou-se nos 90 µL do sobrenadante 10 µL de 5 M ureia. Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 50 °C por 3 minutos, posteriormente centrifugados e 20 µL pipetados com 980 µL água MilliQ. 100 µL do reagente nitroprussiato fenol foi adicionado e os tubos então colocados em banho-maria a 50°C por 20 minutos. As medições foram realizadas em espectrofotômetro a 636 nm.



Figura 3. A. Detalhe da coleta de folhas para avaliação de atividade de urease. B. Plantas coletadas e sendo acondicionadas em sacos identificados. C. Material particionado para secagem. No detalhe, hastes, folhas e pecíolos.

3.5 Preparo e Secagem do Material

O material vegetal foi particionado em folhas, hastes, pecíolos, vagens e grãos (Figura 3C); e foi seco em estufa com circulação de ar a 65°C por 72 horas. Após esse procedimento obteve-se a massa de matéria seca das folhas (MSF), das hastes (MSH), dos pecíolos (MSP), das vagens (MSV), dos grãos (MSG). A matéria seca total (MS) foi obtida pelo somatório das diferentes partes avaliadas.

3.6 Determinação das Concentrações de Nutrientes

O teor total de N foi medido com espectrofotômetro de acordo com o método de Baethgen e Alley (1989) em plantas das duas coletas. Foram quantificadas as concentrações de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Zn e Ni no limbo foliar por EDXRF, conforme metodologia descrita por Tezotto (2010).

3.7 Índices de Eficiência do Uso de Nitrogênio (IEUN)

Determinada a matéria seca e o teor de N nas diferentes partes das plantas em R7, foram calculados os índices de eficiência de utilização e absorção de N:

- (i) Eficiência do Uso de Nitrogênio Absorvido (EUN): conteúdo de N na folha/acumulação total de N;
- (ii) Razão de Eficiência do Nitrogênio (REN): massa de matéria seca planta/acumulação total de N.

3.8 Redistribuição de Nitrogênio

A redistribuição de nitrogênio foi obtida pela diferença no acúmulo total de N nas partes vegetativas da planta entre R5 e R7, dividida pelo total de N nos grãos em R7 (Zhao et. al., 2014). O resultado equivale a porcentagem do N presente no grão com origem nas partes vegetativas da planta, como mostra a equação abaixo.

$$\textit{Redistribuição}(\%) = \frac{(N_{R5} - N_{R7})}{N_{\textit{grãos}}}$$

3.9 Forma de Análise de Resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste F, e as médias comparadas pelo teste de t de Student, a 5% de probabilidade. Para elaboração das curvas de regressão em razão das doses aplicadas de Ni foi utilizado o software Sigma Plot.

4. Resultados e Discussão

4.1 Matéria seca das plantas

Na tabela 2 estão dispostos os dados de matéria seca das plantas coletadas em R7. Com exceção da matéria seca de folhas (MSF), as outras variáveis, sofreram efeito do tipo de adubação nitrogenada realizado. Em todos os casos, a maior matéria seca foi obtida quando se aplicou maior dose de N, ou seja, sob adubação adicional.

Tabela 2. Valores de matéria seca das folhas (MSF), dos pecíolos (MSP), das hastes (MSH), das vagens (MSV) e matéria seca total (MS) de soja no estágio R7, submetidos à diferentes doses de Ni e N.

Adubação Nitrogenada	Dose Ni ppm	MSF	MSP	MSH	MSV	MSG	MS
Normal	0	31,94	7,32	15,44	21,60	36,32	116,56
	5	21,95	6,25	13,65	18,09	18,63	84,14
	25	28,71	4,70	11,40	13,29	10,79	68,88
	Média	27,53	6,09 a	13,50 a	17,66 a	21,91 a	89,65 a
Adicional	0	26,41	7,11	17,49	29,20	41,44	122,97
	5	26,50	7,97	20,79	27,18	37,72	120,14
	25	31,74	7,51	18,94	21,72	27,52	110,58
	Média	28,21	7,53 b	19,07 b	26,03 b	35,56 b	117,90 b
Pr > F	N	0,508 ^{ns}	0,040 *	0,002 *	0,003 *	0,039 *	0,011 *
	Ni	0,028 *	0,209 ^{ns}	0,499 ^{ns}	0,009 *	0,029 *	0,026 *
	N x Ni	0,037 *	0,089 ^{ns}	0,159 ^{ns}	0,523 ^{ns}	0,452 ^{ns}	0,270 ^{ns}
	CV %	8,18	15,85	14,29	14,62	28,13	23,65

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%; ^{ns} não significativo; * significativo

A variável MSF respondeu à interação entre N e Ni. Verifica-se na figura 4, que com o acréscimo de Ni sob adubação adicional, há aumento significativo de MSF apenas na dose de 25ppm, onde cerca de 20% de matéria seca foi produzida a mais. Em condições normais as plantas com Ni obtiveram menor MSF em relação às que não receberam o nutriente.

Com efeito exclusivo das doses de Ni, MSV, MSG e MS têm o mesmo padrão de resposta. Conforme se acrescenta Ni, a matéria seca decai linearmente. As três variáveis são relacionadas entre si pois diminuindo-se a MSV, por consequência diminui-se a massa de grãos que proporcionalmente seria produzida. Como a contribuição de MSG para a MS é maior, em relação às outras partes avaliadas, sua redução ocasiona a queda significativa na MS.

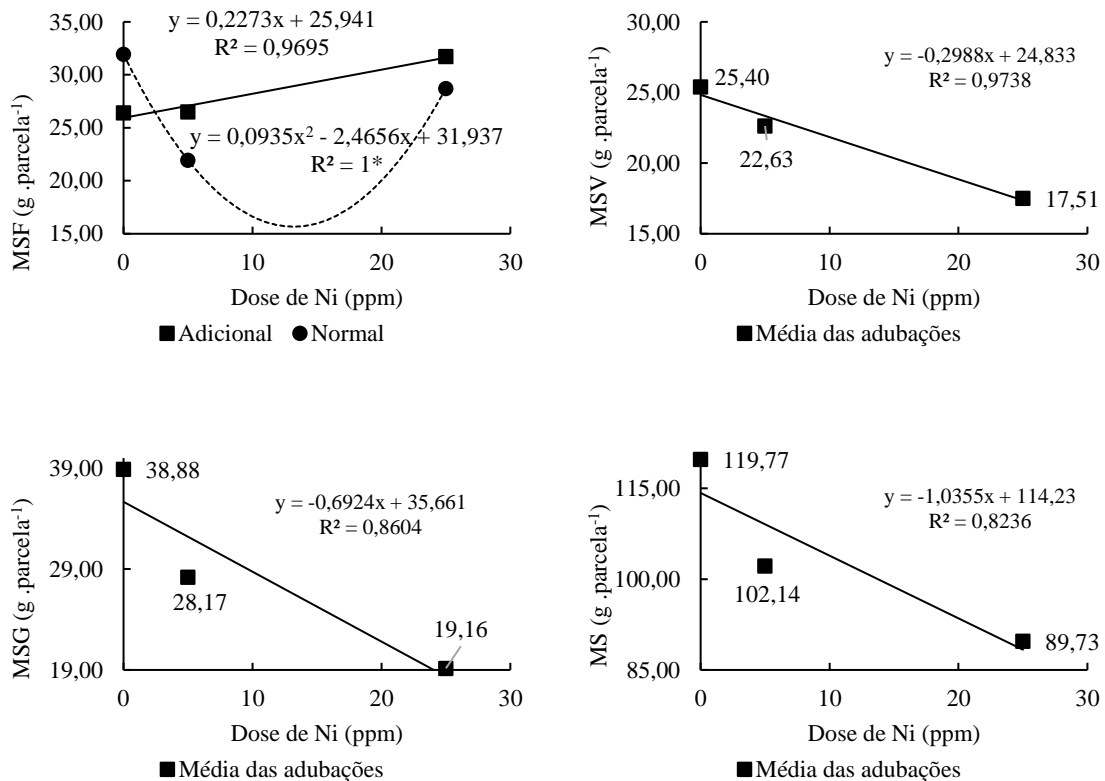


Figura 4. Matéria seca de folhas (MSF), matéria seca de vagens (MSV), matéria seca de grãos (MSG) e matéria seca total (MS), em g.parc⁻¹, em plantas de soja no estágio R7 submetidas à diferentes doses de N e Ni.

Crooke e Inkson (1955) observaram reduções médias de 12,9% na MS de plantas de soja, com adição de Ni. Outros relatos indicam que o acúmulo de Ni, como se verifica na Tabela 6, pode reduzir a produção de MS, decaindo o número de vagens, peso de 1000 sementes e produção de grãos (Tripathy et al., 1981). Ni ainda pode reduzir a produção de matéria seca de raízes e MS (Madhava Rao e Sresty 2000; Pandey e Sharma 2002). Klucas et al. (1983) não obteve diferenças matéria seca total da parte aérea de plantas de soja fertilizadas com Ni em relação às não fertilizadas. O mesmo autor verificou maiores produções de matéria seca quando mais N foi fornecido ao sistema.

Em contrapartida, observou-se que se fornecendo Ni às sementes de soja, a produção de MS da mesma era favorecida em doses intermediárias e decaía com o aumento das doses do micronutriente (Lavres et al., 2016). Kutman et al. (2013) relatou aumento da produção de grãos proporcional à dose de Ni. O que contrasta com os dados obtidos pelo presente estudo, onde a produção de MSG decaí com a adição de Ni.

A literatura cita possíveis efeitos promovidos por altas doses de Ni sobre o desenvolvimento das plantas como, reduções em crescimento (Molas, 2002), interferências negativas e/ou positivas na absorção, transporte de nutrientes e fotossíntese (Chen et al, 2009), entre outros. Quanto à MSG, tem-se o efeito do micronutriente no atraso da senescência da planta, retardando a remobilização de carboidratos para os grãos, o que conseqüentemente reduziria a massa de grãos produzidos (Yang et al. 1997). Devido à variedade de respostas possíveis e, como dito anteriormente, à complexidade dos fatores envolvidos referentes à relação planta e Ni, é difícil determinar o que realmente ocorre, pois no presente trabalho não foi possível isolar cada um deles.

4.2 Extração e determinação da atividade da enzima urease

Segundo observa-se na tabela 3, não houve influência do nível de adubação nitrogenada sobre a atividade da enzima urease. Contudo, as doses de Ni e a interação entre N e Ni afetaram significativamente a variável em questão.

Tabela 3. Atividade de urease em folhas de soja submetidas às doses de Ni e N.

Adubação Nitrogenada	Dose Ni ppm	Atividade de urease $\mu\text{mol.NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Normal	0	4,01
	5	11,20
	25	15,15
	Média	10,12
Adicional	0	4,37
	5	14,67
	25	13,72
	Média	10,92
Pr > F	N	0,3291 ^{ns}
	Ni	<0,0001*
	N x Ni	0,0166 *
	CV %	12,35

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%;
^{ns} não significativo; * significativo

Em ambos os níveis de adubação nitrogenada obteve-se respostas semelhantes e altamente significativas às doses de Ni (Figura 5). Com o fornecimento de Ni em doses entre 5 e 25 ppm, aumentou-se até mais de três vezes a atividade da enzima urease quando comparado às plantas sem adição de Ni. No presente estudo, o fornecimento de Ni às plantas de soja promoveu o aumento da atividade enzimática, fato que era esperado, visto que o micronutriente Ni é o ativador da enzima urease (Dixon et al., 1975), corrobora com os dados obtidos por Gerendàs (1998, 1999), (Polacco et al., 2013) e (Kutman et al., 2013). Lavres et al. (2016) também observou a elevação de cerca de três vezes a atividade foliar da enzima urease com a aplicação de Ni em sementes de soja. Klucas et al. (1983) obteve aumentos de até sete vezes na atividade de urease em folhas de soja com adição de Ni e nitrato como fonte de N. Para efeito de comparação, no mesmo estudo, soja com N advindo somente da fixação biológica suplementada com Ni, teve a atividade de urease aumentada em dez vezes, fato que mostra o potencial da resposta de Ni a campo.

Valores para a atividade da enzima urease variaram entre 7,4 e 21,9 $\mu\text{mol.NH}_4^+.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em folhas de soja (Hogan et al., 1983). O mesmo autor classifica a abrangência comum da atividade de urease em plantas como a soja entre 2,5 e 20 $\mu\text{mol.NH}_4^+.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Dalton et al., relatou a abrangência da atividade de urease entre 2,9 e 16,4 $\mu\text{mol.NH}_4^+.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para 0 e 10 ppm de Ni, respectivamente. Portanto, os valores obtidos com essa variável no presente estudo estão em conformidade com a literatura.

Em estudo sobre o efeito do Ni sobre a soja, Dalton et al. (1985) obteve aumento da atividade de urease conforme as doses de Ni fornecidas eram maiores. Fato observado em diferentes épocas de avaliações realizadas no estudo em questão, onde aumentou-se a atividade da enzima em até 100% com adição de 10 ppm de Ni

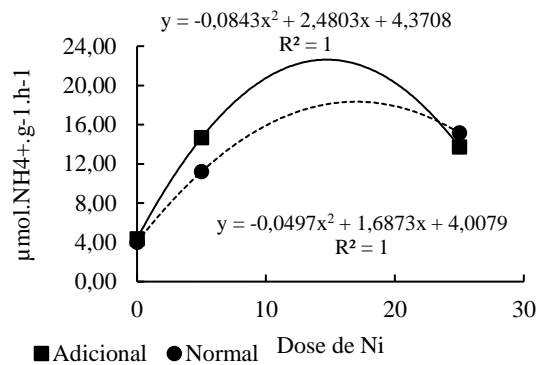


Figura 5. Atividade da enzima urease em folhas de soja submetida a doses diferentes de Ni e N.

As placas utilizadas para a determinação da atividade de urease por espectrofotometria estão exemplificadas na figura 6. Verifica-se visualmente diferentes tonalidades de azul, correspondentes às dosagens de Ni fornecidas e respectiva atividade de urease. Quanto mais escura é a coloração azul, maior é atividade da enzima urease.

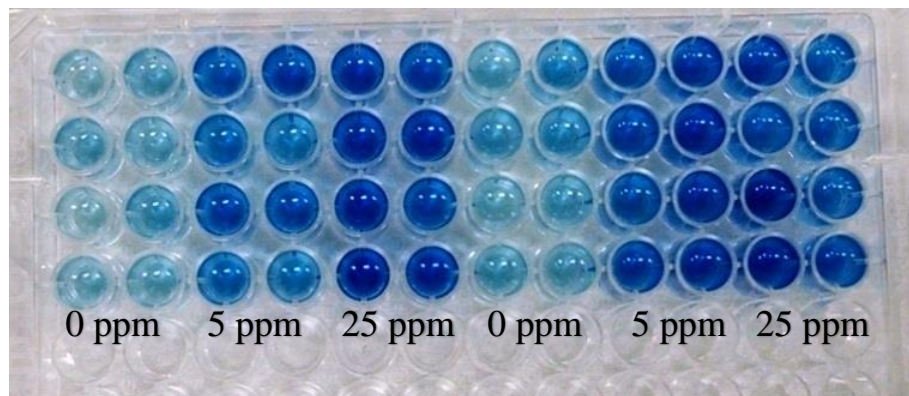


Figura 6. Placa para leitura de absorvância. As diferentes colorações devido aos tratamentos.

4.3 Teor total de N

O conteúdo total de N em diferentes partes de plantas de soja está disposto nas tabelas 4 e 5, para a coleta de plantas realizada no início do enchimento de grãos, em R5; e para a coleta na maturidade fisiológica em R7, respectivamente.

Tabela 4. Acúmulo total de nitrogênio nas diferentes partes da planta de soja no estágio R5 submetidas à diferentes doses de Ni e N.

Adubação Nitrogenada	Dose Ni ppm	Folha	Pecíolo	Haste g.parcela ⁻¹	Vagem	Total
Normal	0	4,65	0,70	1,47	0,51	7,14
	5	5,24	0,66	1,62	0,71	8,60
	25	4,26	0,63	1,22	0,34	5,83
	Média	4,72	0,66	1,44	0,52	7,19
Adicional	0	4,63	0,63	1,90	0,54	7,99
	5	4,55	0,74	1,33	0,48	6,47
	25	4,45	0,82	1,44	0,44	6,34
	Média	4,54	0,73	1,56	0,49	6,93
Pr > F	N	0,334 ^{ns}	0,431 ^{ns}	0,265 ^{ns}	0,147 ^{ns}	0,585 ^{ns}
	Ni	0,069 ^{ns}	0,754 ^{ns}	0,135 ^{ns}	0,018 [*]	0,025 [*]
	N x Ni	0,130 ^{ns}	0,533 ^{ns}	0,239 ^{ns}	0,007 [*]	0,025 [*]
	CV %	9,22	21,38	19,27	18,89	10,36

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%; ^{ns} não significativo; * significativo

No primeiro caso, somente o N-total das vagens e acumulado em toda a planta sofreu alteração devido à interação entre o tipo de adubação nitrogenada e as doses de Ni. Obteve-se comportamento semelhante para ambas as variáveis (Figura 7). As doses crescentes de Ni reduzem o acúmulo de N sob adubação adicional. No entanto, em condições normais, os aumentos no acúmulo de N em vagens e total foram crescentes até doses intermediárias de Ni, decaindo com a mais elevada para níveis abaixo dos obtidos na ausência de Ni.

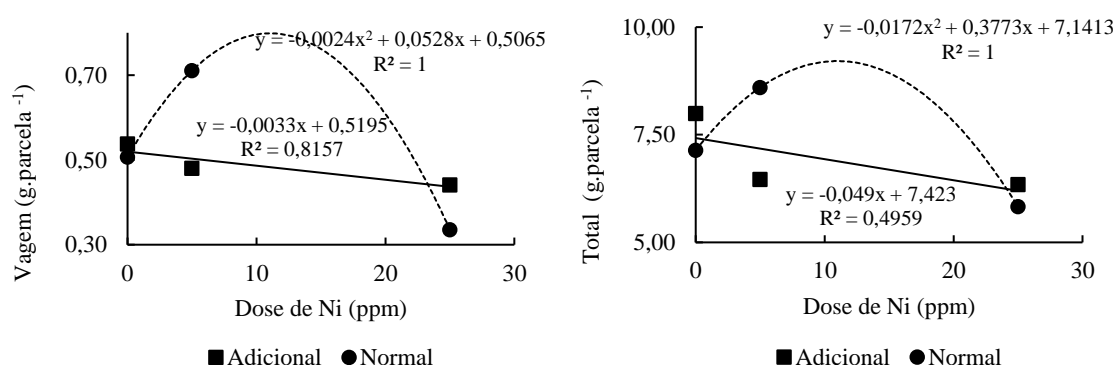


Figura 7. Acúmulo de N em vagens e total (g.parcela⁻¹) em plantas de soja no estágio R5 submetidas a diferentes doses de Ni e N.

Em R7, a acumulação em folhas e vagens também foi afetada pela interação entre N e Ni; o conteúdo de N nos grãos, pelas doses de Ni e adubação nitrogenada

separadamente; e nas hastes, apenas a adubação nitrogenada teve efeito significativo na acumulação de N, sendo maior sob níveis adicionais.

Tabela 5. Acúmulo total de nitrogênio nas diferentes partes da planta de soja no estágio R7 submetidas à diferentes doses de Ni e N.

Adubação Nitrogenada	Dose Ni ppm	Folha	Pecíolo	Haste	Vagem	Grão	Total
		g.parcela ⁻¹					
Normal	0	2,34	0,36	1,26	1,76	2,25	10,60
	5	4,22	0,45	1,49	2,01	3,08	11,88
	25	3,46	0,28	0,86	0,85	0,70	5,93
	Média	3,34	0,36	1,20 a	1,54	2,01 a	9,47
Adicional	0	2,96	0,44	1,26	3,14	6,63	14,48
	5	4,00	0,41	1,15	1,93	5,90	14,07
	25	3,06	0,38	1,71	2,16	6,14	8,91
	Média	3,34	0,41	1,37 b	2,41	6,22 b	12,49
Pr > F	N	0,545 ^{ns}	0,297 ^{ns}	0,017 [*]	0,042 [*]	0,003 [*]	0,631 ^{ns}
	Ni	0,002 [*]	0,397 ^{ns}	0,310 ^{ns}	0,006 [*]	0,001 [*]	0,059 ^{ns}
	N x Ni	0,004 [*]	0,294 ^{ns}	0,246 ^{ns}	0,018 [*]	0,084 ^{ns}	0,220 ^{ns}
	CV %	9,21	20,78	20,66	13,89	20,53	21,49

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%;
^{ns} não significativo; ^{*} significativo

Na maturidade fisiológica, o acúmulo de N nas folhas comportou-se de maneira semelhante para ambos os níveis de adubação nitrogenada. A adição de Ni promoveu aumento no acúmulo em relação às plantas com ausência do metal. A tendência observada é de elevação de até 70% em doses intermediárias de Ni e posteriormente decaimento nas doses maiores, mantendo-se acima dos valores referentes as 0 ppm (Figura 8).

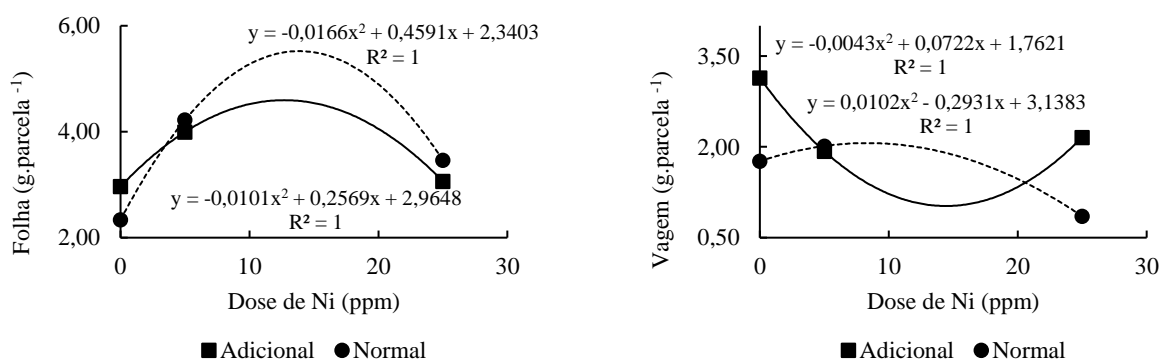


Figura 8. Acúmulo total de N em folhas de soja no estágio R7 submetidas a diferentes doses de Ni e N.

Sob condições normais, o N acumulado nas vagens em R7 sofre aumento de 14% na dose de 5 ppm, mas decai para cerca da metade do valor inicial, quando na dose de 25 ppm. Quando adubação adicional foi utilizada, adições de Ni promovem a redução do N acumulado (Figura 8).

Auxiliando-se da Tabela 3, podemos verificar que, com a adição de Ni, a atividade da enzima urease se eleva. Com esse aumento, mais rapidamente a ureia advinda da quebra do N armazenado na forma de arginase nos tecidos vegetativos é quebrada em amônia e CO₂, e, portanto, mais rápido esse N poderá ser assimilado nos grãos (Kutman et al., 2013). Desse modo, o processo de redistribuição é mais intenso e contribui com maior parcela do N presente nos grãos, como se pode observar na tabela 7.

Dados semelhante foram obtidos por Lavres et al. (2016). Em estudo com aplicação de doses crescente de Ni em sementes de soja antes do plantio, obteve-se que quanto maior a dose de Ni, maior a concentração de N nas folhas, não havendo, no entanto, queda do teor nas dosagens mais altas. Ressalta-se que no presente estudo, a aplicação de Ni se deu com solução aquosa sobre o substrato com as plantas já emergidas.

Aplicação de Ni promoveu aumento da concentração de N nos grãos e na parte aérea em plantas de soja no estágio R7. Aumentos de até 35% de N nos grãos foram observados com doses mais elevadas de N. (Lavres et al., 2016).

Na figura 9, observa-se que a adição de doses crescentes de Ni promoveu a queda linear do N acumulado nos grãos de soja.

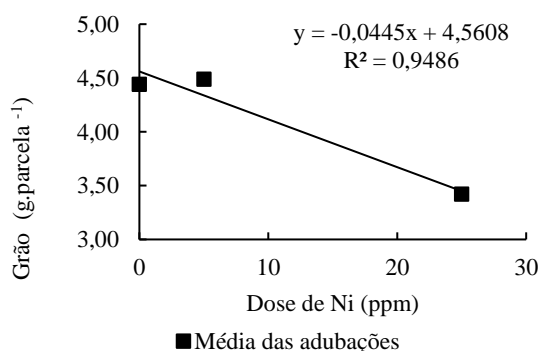


Figura 9. Acúmulo total de N em grãos de soja no estágio R7 submetidas a diferentes doses de Ni.

Não houve diferença no teor total de N na planta toda em função do Ni. Klucas et al. (1983) também não observou diferença estatística na N-total acumulado em plantas de soja com a adição de Ni.

4.4 Análise da concentração de nutrientes das plantas

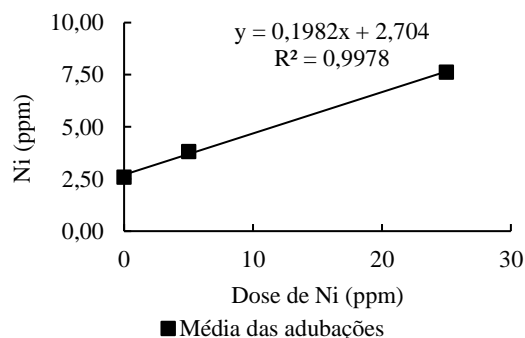
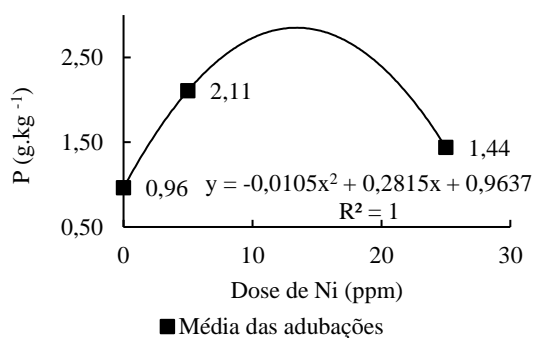
Não houve efeito das adubações nitrogenadas, nem de interação dos fatores sobre a concentração dos nutrientes nas folhas de soja como mostra a tabela 6. Houve apenas influência das doses de Ni sobre os teores de fósforo (P) e do próprio micronutriente.

A figura 10 mostra o aumento nos teores de P na dose intermediária de Ni, com posterior decadência na dose mais elevada. Contudo, as concentrações do nutriente foram sempre maiores com aplicação de Ni se comparadas à dose 0 ppm. O efeito observado em relação ao P, em R7, também foi verificado por Lavres et al. (2016), onde as concentrações foliares de P decaíram com fornecimento de doses elevadas de Ni. O resultado pode advir do efeito das doses crescentes de Ni e a interação com P, que pode causar a redução ou aumento das concentrações (Cataldo et al., 1978) ou até interferindo na absorção dos mesmos (Chen et al., 2009). Cooke e Inkson (1955) relataram redução na absorção de P em plantas fertilizadas com Ni. A redução no teor foliar de P também pode ser efeito da queda de MSF com a adição de Ni (Tabela 2 e Figura 4), o que ocasionaria aumento na concentração do nutriente nas folhas (Jarrel; Beverly; 1981).

Tabela 6. Concentração de nutrientes em folhas de soja no estágio R7 submetidas a doses de N e Ni.

Adubação Nitrogenada	Dose Ni ppm	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Ni
		g.Kg MS ⁻¹						ppm			
Normal	0	6,95	1,03	2,71	2,45	10,43	78,66	238,00	0,64	114,50	1,32
	5	8,48	2,30	3,61	3,42	11,08	65,34	258,13	0,61	85,73	3,53
	25	6,97	1,43	2,99	2,97	11,05	71,70	339,41	0,63	145,29	8,29
Média		7,46	1,59	3,10	2,95	10,85	71,90	278,51	0,63	115,18	4,38
Adicional	0	7,82	0,89	2,68	2,70	10,99	67,56	338,66	0,59	104,05	3,87
	5	7,48	1,92	3,63	3,68	9,86	67,01	175,10	0,64	93,87	4,13
	25	8,83	1,45	3,85	2,65	10,45	66,92	209,98	0,67	121,81	6,98
Média		8,05	1,42	3,39	3,01	10,43	67,17	241,24	0,63	106,58	4,99
Pr > F	N	0,221 ^{ns}	0,561 ^{ns}	0,314 ^{ns}	0,656 ^{ns}	0,388 ^{ns}	0,338 ^{ns}	0,180 ^{ns}	0,897 ^{ns}	0,300 ^{ns}	0,148 ^{ns}
	Ni	0,485 ^{ns}	0,039 [*]	0,121 ^{ns}	0,123 ^{ns}	0,862 ^{ns}	0,499 ^{ns}	0,483 ^{ns}	0,859 ^{ns}	0,055 ^{ns}	0,018 [*]
	N x Ni	0,081 ^{ns}	0,993 ^{ns}	0,698 ^{ns}	0,867 ^{ns}	0,296 ^{ns}	0,553 ^{ns}	0,155 ^{ns}	0,730 ^{ns}	0,368 ^{ns}	0,308 ^{ns}
	CV %	13,45	20,09	24,36	23,22	10,36	16,50	38,02	19,29	24,35	5,90

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%;
^{ns} não significativo; * significativo

Figura 10. Teor de fósforo (g.kg⁻¹) e teor de Ni (ppm) em folhas de soja no estágio R7 submetidas a diferentes doses de Ni.

Verificou-se também o efeito da adição de doses crescentes de Ni sobre a concentração do próprio nutriente nas folhas de soja. Quanto maior a dose de Ni aplicada, maior é a concentração do mesmo nas folhas coletadas em R7. Na média das adubações, com a aplicação de 25ppm de Ni, sua concentração nas folhas chega a ser três vezes maior do que nas folhas de plantas que não receberam aplicações.

O teor de Ni nas folhas aumentou proporcionalmente ao aumento das doses aplicadas, como observado por Dalton et al. (1985), que relatou aumento linear nas concentrações de Ni em folhas, raízes, ramos e nódulos de soja conforme se fornecia

Ni; e Lavres et al. (2016), onde concentração de Ni na parte aérea de soja aumentou proporcionalmente às doses de Ni fornecidas. Na cultura do café, Tezotto (2015) obteve maiores teores de Ni em folhas, raízes e ramos de com o maior fornecimento do metal às plantas. O mesmo efeito é relatado em plantas medicinais por Teixeira da Silva et al. (2012).

4.5 Redistribuição do Nitrogênio

Observa-se que a redistribuição de N foi altamente responsiva aos fatores de variação empregados, sendo afetada pela interação deles (Tabela 7).

Tabela 7. Redistribuição do nitrogênio (%) em plantas de soja submetidas a doses de Ni e N.

Adubação Nitrogenada	Dose Ni ppm	Redistribuição N %
Normal	0	21,8
	5	69,1
	25	62,8
	Média	51,3
Adicional	0	24,3
	5	26,4
	25	25,7
	Média	25,4
Pr > F	N	0,005 *
	Ni	0,005 *
	N x Ni	0,006 *
	CV %	5,33

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%;
ns não significativo; * significativo

Pela figura 11, verifica-se que a resposta à adição de Ni sob adubação adicional não é significativa. Sob níveis normais de N, situação que seria encontrada a campo, o fornecimento de Ni elevou a contribuição do processo de redistribuição sobre o N contido nos grãos em até três vezes o obtido sem adição do micronutriente. Em média 65,95% do total de N dos grãos advém do processo de redistribuição nesse caso. Isso significa dizer que, com a adição de Ni, a planta foi capaz de melhor utilizar o N armazenado e translocá-lo aos grãos, possibilitando que menos N fosse deixado nos restos culturais.

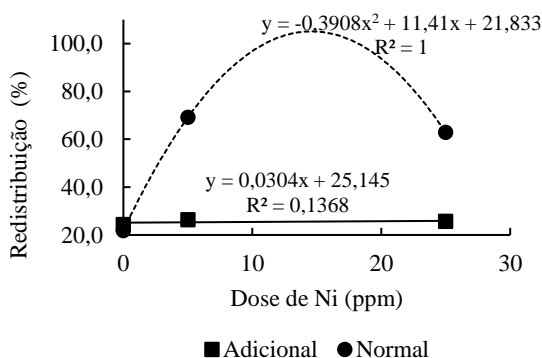


Figura 11. Redistribuição de nitrogênio em plantas de soja submetidas a diferentes doses de Ni e N.

A redistribuição é, para fins de cálculo, a diferença do acúmulo de N nos órgãos vegetativos entre R5 e R7 (tabelas 4 e 5, respectivamente), dividida pela quantidade total de N nos grãos (Zhao et. al., 2014). A quantidade de N nos grãos decai conforme aumentam as doses de Ni (Figura 9), o N-total nas partes vegetativas em R5 é somente alterado quando em adubação nitrogenada normal, aumentando em doses intermediárias de Ni (Figura 7) e em R7 não sofre alterações significativas (Tabela 5). Assim, o comportamento das variáveis envolvidas no cálculo da redistribuição explica o que ocorre na figura 11: não há resposta há adição de Ni sob adubação adicional e sob condição normal, a adição de Ni promove aumento da redistribuição de N na planta.

Além disso, há de se considerar a enzima urease. Esta enzima tem função de metabolizar a ureia proveniente da quebra da arginina pela arginase (redistribuição) em CO₂ e amônia (Witte, 2011), a qual pode então ser incorporada aos grãos (Gerendás et al., 1999). Dessa maneira, a maior atividade de urease proporcionada pelo acréscimo de Ni, possibilitaria maior velocidade no metabolismo da ureia, o que aumentaria a contribuição do processo de redistribuição no N presente nos grãos.

Os valores encontrados para a contribuição da redistribuição para o enchimento de grãos variam conforme a dose de Ni e N; e por esse motivo, diferem do encontrado na literatura. Segundo Hanway & Weber (1971) cerca de 50% do N dos grãos de soja seria proveniente do processo de redistribuição. Os dados obtidos com a presente pesquisa mostraram que em plantas que não receberam adição de Ni, a redistribuição correspondeu em média a 23% do total de N nos grãos. Entretanto, com o fornecimento de Ni, em média, 65,95 % do N nos grãos advém desse processo em

condições normais. Contudo, em situações onde há excesso de N no sistema, os valores encontrados foram próximos a 25% em média, evidenciando que, em níveis de N acima do que a planta necessitaria para seu ciclo, o processo de redistribuição teve menor importância no processo de enchimento de grãos. Dados semelhantes aos obtidos por Tezzoto (2015), onde a redistribuição foi maior em níveis menores de N para o cafeeiro.

Sob condições normais e sem fornecimento de Ni às plantas, Zeithner et al. (1982) relatou que, em função da cultivar, de 33 a 100% do N nos grãos pode advir do processo de redistribuição. Zhao et al. (2014) avaliando a redistribuição de N em quatro cultivares de soja obteve valores de redistribuição variando entre 14,5 e 44,7% em duas safras distintas. O autor ainda verificou que há diferença de até 10 pontos percentuais na redistribuição da mesma cultivar entre os anos, mostrando a variabilidade de respostas da variável em questão. Foram obtidos valores de redistribuição de N para os grãos de soja entre 45,5 e 63,7% por Guffy et al. (1992), para diferentes cultivares.

4.6 Índices de eficiência de uso do N (IEUN)

Os índices de eficiência de uso de N estão dispostos na tabela 8. Ainda que de forma distinta, os dois índices responderam à interação entre adubação nitrogenada e doses de Ni.

Doses crescentes de Ni aumentaram a eficiência de uso do nitrogênio absorvido (EUN) sob ambos os níveis de adubação nitrogenada (Tabela 8 e Figura 12). A magnitude desse efeito muda conforme a dose de Ni, tornando-se mais evidente na dosagem de 25 ppm, onde sob adubação normal, a EUN foi quase 100% em relação à testemunha sem Ni. Além disso, embora não tenha havido diferença estatística entre os tipos de adubação nitrogenada, com adição de altas doses de Ni, próximas a 25 ppm, observa-se a tendência de que com menos N disponível à planta, mais ela é eficiente em utilizá-lo, pois EUN obtido foi 40% maior em relação à adubação adicional. Para verificar a veracidade desse fato seriam necessárias dosagens mais abrangentes de Ni, o que não foi possível no presente estudo.

Tabela 8. Índices de eficiência de uso de nitrogênio em soja submetida a doses distintas de N e Ni. Eficiência de uso do N absorvido (EUN) e razão de eficiência de N (REN).

Adubação Nitrogenada	Dose Ni ppm	EUN %	REN g MS.gN ⁻¹
Normal	0	26,85	8,90
	5	29,55	8,39
	25	53,62	7,68
	Média	36,67	8,32
Adicional	0	22,55	8,49
	5	32,42	9,24
	25	38,52	8,77
	Média	31,16	8,84
Pr > F	N	0,090 ^{ns}	0,018 [*]
	Ni	0,0002 [*]	0,042 [*]
	N x Ni	0,050 [*]	0,005 [*]
	CV %	14,20	3,51

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%;
^{ns} não significativo; ^{*} significativo

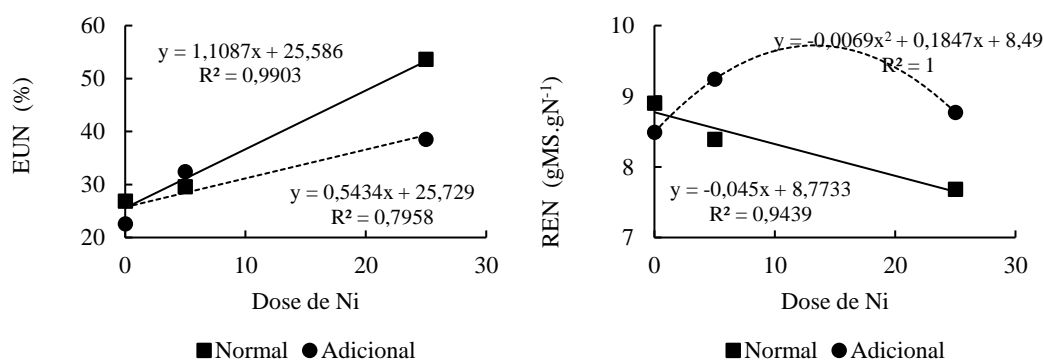


Figura 12. Eficiência de uso do nitrogênio absorvido (EUN - %) e razão de eficiência de nitrogênio (REN – gMS.gN⁻¹) em plantas de soja submetidas a diferentes doses de Ni e N.

Este índice comportou-se da mesma maneira como o encontrado por Tezotto (2015) em cafeeiro, onde a maior disponibilidade de Ni às plantas promoveu o aumento da EUN. As respostas quanto à EUN estão em conformidade com o esperado, visto que, com a adição de doses crescentes de Ni, a acumulação de N não é alterada seja qual for a adubação nitrogenada (Tabela 5), mas o N-total nas folhas cresce em doses intermediárias de Ni, mantendo-se superior às plantas sem Ni nas doses elevadas. Sob adubação normal os valores são proporcionalmente maiores em relação à adubação adicional (Figura 8), o que explica a maior EUN encontrada no presente estudo. A maior atividade da enzima urease proporcionada pelo acréscimo

de Ni (Tabela 3), também contribui para maior eficiência de uso do N, pois aumenta a contribuição do processo de redistribuição no N presente nos grãos, fazendo com que mais do N absorvido pela planta seja aproveitado e destinado à parte reprodutiva, ao invés de permanecer nos restos culturais após colheita. Portanto, obtém-se melhor uso do N absorvido, com a adição de Ni.

Quanto à razão de eficiência de nitrogênio (REN) nota-se que sob adubação normal e conforme se aumenta a dose de Ni fornecida, há redução no valor de REN, ou seja, para cada grama de N presente na planta, menor quantidade de MS é produzida quando Ni é adicionado no sistema. Contudo, sob níveis adicionais de N, REN sofre leve aumento com fornecimento de N; e mesmo decaindo na dose mais elevada, mantém-se, acima dos valores com 0 ppm. Isso demonstra que com disponibilidade de N além do necessário para a realização de seu ciclo, a soja consegue produzir maior quantidade de MS por grama do nutriente quando é fertilizada com doses entre 5 e 25 ppm de Ni (Figura 12).

REN é calculada pela razão entre MS e N total acumulado na planta. Desse modo, ao observar a dinâmica das variáveis utilizadas no cálculo, tem-se que o acréscimo de Ni reduz a MS em ambas as adubações (Tabela 2, Figura 4) e a acumulação de N em R7 mantém-se inalterada (Tabela 5). Desse modo, como a MS sob adubação adicional é significativamente maior que em adubação normal (Tabela 2), os valores obtidos de REN são mais elevados na adubação adicional. Tendência semelhante quanto à dinâmica da variável REN, que decai com a adição de Ni, foi também obtida por Tezotto (2015) em estudo com cafeeiro mencionado anteriormente.

5. Conclusões

O efeito causado pelo fornecimento de Ni a planta e sua interação com níveis de N aos quais a mesma é submetida sobre a matéria seca da soja, precisa ser melhor elucidado. As respostas foram variadas possivelmente devido à complexidade das interações Ni-planta, que têm influência sobre o crescimento e desenvolvimento da soja, além de interferir sobre absorção de outros nutrientes. De modo geral, o fornecimento do micronutriente ocasionou aumento da concentração do mesmo nas folhas e a queda de produção de grãos e matéria seca de soja.

Aumentou-se em mais de três vezes a atividade da enzima urease com o fornecimento de Ni às plantas, independentemente da disponibilidade de N no sistema. Embora haja redução no acúmulo de N nos grãos, em condições normais encontradas a campo, o fornecimento de Ni à soja foi capaz de aumentar em cerca de três vezes a contribuição do N advindo do processo de redistribuição no total de N acumulado nos mesmos.

O fornecimento de Ni às plantas de soja contribui para melhor uso do N absorvido, como mostra o índice EUN (Eficiência de uso do nitrogênio absorvido), que em condições normais elevou-se de 10 a 99% com a adição do micronutriente.

6. Referências Bibliográficas

BAETHGEN, W.E.; ALLEY, M.M. A manual colorimetric procedure of measuring ammonium nitrogen in soil and plant. *Commun Soil Sci Plant*. v. 20, p. 961-969, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, P.H., WELCH, R.M., CARY, E.E. Nickel: a micronutrient essential for higher plants, *Plant Physiol*. v. 85, p. 801–803, 1987.

CATALDO, D. A.; GARLAND, T. R.; WILDUNG, R. E. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiology*, v. 62, n. 4, p. 563-565, 1978.

CATALDO, D.A., HAROON, M., SCHREADER, L.E., YOUNG, V.L. 1 Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci Plant*, v. 6, p. 71-80, 1975.

CHEN, C.; HUANH, D.; LIU, J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean, Brighton*, v. n. 4/5, p. 304-313, 2009.

CROOKE, W. M.; INKSON, R. H. E. The relationship between nickel toxicity and major nutrient supply. *Plant and Soil* v. 1, no 1. 1955.

DALTON, D. A.; EVANS, H. J.; HANUS, F. J. Stimulation by nickel of soil microbial urease activity and urease and hydrogenase activities in soybeans grown in a low-nickel soil. *Plant and Soil*, v. 88, p. 245-258, 1985.

DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. Jack Bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of the American Chemical Society*, Easton, v. 97, n. 14, p. 4131-4133, 1975.

ESKEW, D.L.; WELCH, R.M.; CARY, E.E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science*, v.222, p.621-623, 1983.

ESKEW, D.L.; WELCH, R.M.; NORVELL, W.A. Nickel in higher plants: Further evidence for an essential role. *Plant Physiology*, v.76, p.691-693, 1984.

- GERENDÁS, J.; POLACCO, J.C.; FREYERMUTH, S.K. & SATTELMACHER, B. Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 162:241-256, 1999.
- GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH_4NO_3 or urea as N source, *Ann. Bot. London*. 83, p. 65-71, 1999.
- GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* con var. giromontiina). *Plant Soil*, v. 196, p. 217-222, 1997.
- GERENDÁS, J.; ZHU, Z., SATTELMACHER, B. Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp Botany*.v.49, n. 326, p. 1545-1554, 1998.
- GUFFY, R. D.; VASILAS, B. L.; HESKETH, J. D. Nitrogen partitioning and net photosynthesis in soybean genotypes differing in seed filling duration and N source. *Biotronics* v. 21, p. 1-10, 1992.
- HANWAY, J.J., WEBER, C.R. Accumulating of N, P and K by soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) plants. *Agron J.*, v. 63, p. 406-408, 1971.
- HOGAN, M. E., SWIFT, I. E., DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues, *Phytochemistry*, v. 22, n. 3, p. 663-667, 1983.
- JARREL, W. M.; BEVERLY, R. B. The dilution effect in plant nutrition studies. *Advance Agronomy*, v. 34, p. 197-224, 1981.
- KLUCAS, R. V.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Nickel: A micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, v. 86, p. 2253-2257, 1983.
- KOJIMA, S., BOHNER, A., GASSERT, B., et al., AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots, *Plant J.* v. 52, p. 30-40, 2007.
- KOJIMA, S.; BOHNER, A.; WIREN, von N. Molecular mechanisms of urea transport in plants, *J. Membr. Biol.* v. 212, p. 83-91, 2006.
- KROM, M.D. Spectrophotometric determination of ammonia: study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst*, v. 105, p. 305-316, 1980.
- KUTMAN, B.Y., KUTMAN, U.B., ÇAKMAK, I. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean, *Plant Soil* v. 363, p. 61-75, 2013.
- LAU, O.L., YANG, S.F. Inhibition of ethylene production by cobaltous ion. *Plant Physiology*, v. 58, p. 114-117, 1976.
- LAVRES, J., FRANCO, G. C.; CÂMARA, G. M. de S. Soybean seed treatment with Nickel improves biological nitrogen fixation and Urease activity. *Front. Environ.Sci.* p. 4-37, 2016.
- LEE, D.W.; BRAMMEIER, S.; SMITH, A.P. The selective advantages of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. *Biotropica*, Washington, v. 19, n. 1, p. 40-49, 1987.

- LIU, L.H., LUDEWIG, U., FROMMER, W.B., et al., AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in Arabidopsis, *Plant Cell* v.15, p. 790–800, 2003.
- MADHAVA RAO, K. V.; SRESTY, T. V. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* v. 157, p. 113-128, 2000.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed., Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press Inc., San Diego, 1995.
- McGARVEY, D.J., CHRISTOFFERSEN, R.E. Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J. Biol. Chem.* V. 267, p. 5964-5967, 1992.
- MEYERBOTHLING, L.E., POLACCO, J.C., CIANZIO, S.R. Pleiotropic soybean mutants defective in both urease isozymes, *Mol. Gen. Genet.* v. 209, p.432–438, 1987.
- MOHLMANN, T.; BERNARD, C.; HACH, S. Nucleoside transport and associated metabolism, *Plant Biol.* v. 12, p. 26-34, 2010.
- MOLAS, J. Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*, v. 47, p. 115-126, 2002
- MORAES, M. F.; ABREU JUNIOR, C. H.; LAVRES JUNIOR, J. Micronutrientes. In: Luís Ignácio Prochnow; Valter Casarin; Sílvia Regina Stipp. (Org.). Boas Práticas para Uso Eficiente de Fertilizantes. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute - (EM EDITORAÇÃO), 2010, v. , p. 1-43.
- MORAN, R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N, N-dimethylformamide. *Plant Physiology*, Rockville, v. 69, p. 1376-1381, 1982.
- NARWAL, R. P.; SINGH, M.; GUPTA, A. P.; KHUSAD, M. S. Nickel and Zn interaction in corn grown on sewer irrigated soil. *Field Crops Research*, v. 7, p. 366 – 372, 1994.
- NINOMIYA, A.; MURATA, M.; TADA, M.; SHIMOISHI, Y. Change in allantoin and arginine contents in *Dioscorea opposita* 'Tsukuneimo' during the growth. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* v. 73, p. 546-551, 2004.
- OSAKI, M., SHINANO, T.; TADANO, T. 1991. Redistribution of carbon and nitrogen compounds from the shoot to the harvesting organ during maturation in field crops. *Soil Sci. Plant Nutr.* v. 37, p.117-128.
- PANDEY, N.; SHARMA, C. P. Effect of heavy metals Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* v. 163, p. 753-758, 2002.
- RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.
- RENNENBERG, H., WILDHAGEN, H., EHLTING, B. Nitrogen nutrition of poplar trees, *Plant Biol.* v. 12, p. 275–291, 2010.
- RENTSCH, D.; SCHMIDT, S.; TEGEDER, M. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants, *FEBS Lett.* v. 581, p. 2281-2289, 2007.

SANTAMARIA P., ELIA, A., SERIO, F., TODARO, E. A survey of nitrate and oxalate content in retail fresh vegetables, *J. Sci. Food Agr.* 79, 1882–1888, 1999.

SHIMIZU, M.M.; MAZZAFERA, P. Compositional changes of proteins and amino acids in germinating coffee seeds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 43, n. 3, p. 259-265, 2000

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; NAEEM, M.; IDREES, M. Beneficial and toxic effects of nickel in relation to medicinal and aromatic plants. *Med and Aro Plant Sci and Biotech.* v. 6, p. 94 – 104, 2012.

TEZOTTO, T. *Metabolismo e qualidade da bebida em cafeeiro expostos ao cádmio, níquel e zinco.* 2010. 123p. (Dissertação de mestrado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo).

TEZOTTO, Tiago. **Metabolismo do nitrogênio e senescência em razão da aplicação de níquel no cafeeiro arábica.** 2015. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

TORISKY, R.S., GRIFFIN, J.D., YENOFISKY, R.L. et al., A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean, *Mol. Gen. Genet.* v. 242, p.404–414, 1994.

TRIPATHY, B. C.; BHATIA, B.; MOHANTY, P. Inactivation of chloroplast photosynthetic electron transport activity by Ni²⁺. *Biochimica et Biophysica Acta* 638, 217-224, 1981.

Van ETTEN, C.H.; KWOLEK, W.F., PETERS, J.E.; BARCLAY, A.S. Plant seeds as protein sources for food or feed. Evaluation based on amino acid composition of 379 species. *J. Agric. Food Chem.* v. 15, p. 1077-1089, 1967.

WALKER, D.W., GRAHAM, R.D., MADISON, J.T., CARY, E.E., WELCH, R.M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Wap.). *Plant Physiol.* v. 79, p. 474-479, 1985.

WANG, W.H., KOHLER, B., CAO, F.Q., et al., Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants, *Plant Sci.* v. 175, p. 467–477, 2008.

WITTE, C-P. Urea metabolism in plants. *Plant Science*, v. 180, p. 431-438, 2011.

WITTE, C-P.; MEDINA-ESCOBAR, N. In-Gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 290, p. 102-107, 2001.

WOLF, B. A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrient status. *Commun Soil Sci Plant Anal.* V. 13, p. 1035-1059, 1982.

WOOD, B.W., REILLY, C.C., NYEZEPIR, A.P. Mouse-ear of pecan: a nickel deficiency, *HortScience* v. 39, p. 1238-1242, 2004.

WOOD, B.W., REILLY, C.C., NYEZEPIR, A.P. Mouse-ear of pecan: I. Symptomatology and occurrence, *HortScience* v. 39, p. 87-94, 2004.

WOOD, B.W., REILLY, C.C., NYEZEPIR, A.P. Mouse-ear of pecan: II. Influence of nutrient applications, *HortScience* v. 39, p. 95-100, 2004.

YANG, J.; WANG, Z.; ZHU, Q. Photosynthetic characteristics, dry matter accumulation and its translocation in inter-subspecific hybrid rice. *Acta Agronomica Sinica*, v. 23, p. 82-88, 1997.

ZEIHER, C.; EGLI, D.B.; LEGGET, J.E; REICOSKY, D.A. Cultivar differences in N redistribution in soybeans. *Agron. J.* v. 74: p.375-379, 1982.

ZHAO, X., ZENG, S.H., FATICHIN, SUSUKI, A., ARIMA, S. Varietal difference in nitrogen redistribution from leaves and its contribution to seed yield in soybean, *Plant Prod. Sci.* v. 17, p. 103-108, 2014.

ZONIA, L.E.; STEBBINS, N.E.; POLACCO, J.C. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol.*, v. 107, p. 1097-1103, 1995.