

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**FERNANDO GIOVANNETTI DE MACEDO**

**Disponibilidade de níquel no sistema solo-planta: efeito de doses e saturações por bases**

**Piracicaba**  
**2016**



**FERNANDO GIOVANNETTI DE MACEDO**

**Disponibilidade de níquel no sistema solo-planta: efeito de doses e  
saturações por bases**

**Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear  
na Agricultura da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na  
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior  
Co-orientador: Dr. Wilson Tadeu Lopes da  
Silva**

**Piracicaba  
2016**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Macedo, Fernando Giovannetti de

Disponibilidade de níquel no sistema solo-planta: efeito de doses e saturações por bases / Fernando Giovannetti de Macedo; orientador José Lavres Junior. - - Piracicaba, 2016.

119 f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ácidos orgânicos 2. Atividade enzimática 3. Girassol 4. Micronutrientes  
5. Nutrição de plantas 6. Soja I. Título

CDU 631.811 : 631.4

*À George Augusto Haddad de Macedo*  
*dedico*

*À quem esse material possa ser útil em seus estudos*  
*Ofereço*



## **Agradecimentos**

Ao meu bom Deus pelas bênçãos sobre bênçãos que recebo em minha vida.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo pela infraestrutura e total amparo intelectual.

Às instituições colaboradoras do projeto de pesquisa: APTA – Piracicaba em nome do pesquisador André Cesar Vitti; EMBRAPA – Instrumentação em nome de Wilson Tadeu Lopes da Silva e Joana Dias Bresolin; IAC em nome de Roberto Tetsuo Tanaka; University of Missouri em nome de Joseph Polacco.

Às instituições: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processo 2012/18226-2); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (processo 141644/2012-5) e; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (processo 99999.003389/2015-04) pela concessão de bolsas durante o doutorado.

Ao Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior – PDSE, pela oportunidade de realizar o intercâmbio.

A equipe do Laboratório de Nutrição Mineral de plantas – LNMP: Cristiane, Felipe, Riviani, André, Flávio, Bruno, Elcio, Aline, Suzi, Cleo, Cássio e Lavres por todo apoio, companheirismo e ajuda sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

Ao professor José Lavres Junior pelo aceite, orientação e ensinamentos ao longo desses quatro anos.

A minha família pelos incentivos de sempre...

A minha esposa Gianni Queiroz Haddad que sempre me apoiou e respeitou minhas decisões profissionais e soube ser pai e mãe do Georjinho quando necessário, meus eternos e incondicionais agradecimentos.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.



*“Feliz é o dia em que aprendemos algo de novo.”*

Henrique Bergamin Filho



## RESUMO

MACEDO, F.G. **Disponibilidade de níquel no sistema solo-planta: efeito de doses e saturações por bases**. 2016. 120f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Por se tratar de um elemento essencial às plantas e um metal pesado ao mesmo tempo, o níquel requer atenção quanto aos aspectos da fisiologia de plantas e ambiental. Além disso, existe um intervalo estreito entre as exigências nutricionais e os teores tóxicos às plantas. Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito do Ni no sistema solo-planta, com foco no ciclo do N e a disponibilidade do elemento no solo, por meio de experimento em condições controladas, utilizando vasos distribuídos inteiramente ao acaso, utilizando-se esquema fatorial 2 x 5, com sete repetições cada tratamento. O primeiro fator foi constituído de duas saturações por base (50 e 70%) e o segundo de cinco doses de Ni (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de solo). Os vasos foram preenchidos com 8 dm<sup>3</sup> de terra e cultivados com soja [*Glycine max* (L.) Merrill] sucedida por girassol (*Helianthus annuus* L.). Os parâmetros qualitativos e quantitativos: altura de plantas (AP), diâmetro do caule (DC), número de nós (NN), estágio fenológico (EF), índice SPAD e, diâmetro do capítulo (DCap) (para girassol) foram avaliadas aos 30 e 60 dias após a emergência (d.a.e.) de cada cultivo. Plantas inteiras de soja, amostradas em quatro vasos de cada tratamento, foram coletadas no estágio R1. Na mesma ocasião foram coletadas amostras de solo da rizosfera. Em seguida, as plantas coletadas foram divididas em: folhas; raízes (nódulos na soja) e parte aérea. Foram determinados nas folhas utilizadas para diagnose em soja e girassol: os teores de macro e micronutrientes, as atividades da redutase do nitrato e da urease e as concentrações dos ácidos orgânicos: oxálico, malônico, succínico, málico, tartárico, fumárico, oxaloacético, cítrico e láctico. Os mesmos ácidos orgânicos foram determinados em raízes secundárias de girassol e nódulos de soja. Foram realizadas avaliações ultraestruturais por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em raízes de girassol, e estruturais e de tonalidade em nódulos de soja, por meio de microscopia de luz. No solo, foram determinadas: atividade urease, desidrogenase, Ni total e fitodisponível pelos métodos: Mehlich-1, Mehlich-3 e DTPA. No período de maturidade fisiológica de cada cultura foi realizada a colheita das plantas dos vasos restantes para determinação de produção de grãos, teores de Ni na planta inteira e Ni e N nos grãos. Ao final dos dois experimentos foi realizada nova coleta de solo para extração sequencial de Ni. O índice SPAD em soja aos 60 d.a.e., a produção de massa seca da parte aérea da soja e da

raiz de girassol foram influenciados pela saturação por bases, doses de níquel e pela a interação destes. Foram influenciados pelas saturações por base e doses de níquel (fatores isolados): para soja: AP aos 60 d.a.e., NN aos 30 e 60 d.a.e., SPAD aos 30 d.a.e.; para girassol: AP e NN aos 30 e 60 d.a.e., DC e SPAD aos 30 d.a.e. As demais variáveis avaliadas aos 30 e 60 d.a.e. foram influenciadas apenas pela saturação por bases, ou doses de Ni separadamente. As plantas de soja e girassol apresentaram maiores teores de Ni nos diferentes tecidos avaliados (exceto grãos) quando cultivadas sob V50%. A produção de grãos de soja e girassol não foi influenciada pelos tratamentos, porém o teor de N dos grãos de soja influenciado pelas doses de Ni na V70%. A atividade da enzima urease nas folhas de soja e girassol foi responsiva positivamente ao aumento das doses de Ni. Quatro dos ácidos orgânicos avaliados e o teor de N nas folhas e nos grãos foram maiores nas plantas cultivadas sob V70% com a dose de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni. As doses de Ni bem com as saturações por bases influenciaram diretamente o balanço de nutrientes das plantas. Os extratores Mehlich-1, Mehlich-3 e DTPA apresentaram elevado coeficiente de correlação entre a fração de Ni disponível no solo e a concentração do elemento nas plantas de soja e girassol, sendo o extrator DTPA o que apresentou maior coeficiente de correlação. O Ni apresentou distribuição variável entre as diferentes frações do solo em função dos tratamentos. Os solos dos tratamentos com saturação por bases de 70% apresentaram maior concentração de Ni ligado a carbonato, comparado aos tratamentos sob saturação por bases de 50%. A distribuição do Ni entre as frações do solo seguiu a seguinte ordem: ligado a carbonato < trocável < ligado a óxidos < matéria orgânica < residual. A saturação por bases exerceu efeito diferenciado para a atividade da urease no solo em função da cultura avaliada. Por sua vez, o Ni exerceu efeito diferenciado sobre a atividade de desidrogenase em função da cultura estudada.

**Palavras-chave:** soja. girassol. micronutrientes. nutrição de plantas. ácidos orgânicos. atividade enzimática

## ABSTRACT

MACEDO, F.G. Nickel availability on soil-plant system: effects of Ni rates and saturations base. 2016. 120f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

As an essential element for plants and a heavy metal at the same time, nickel requires attention on the aspects of the physiology of plants and environmental. Furthermore, there is a narrow range between nutritional requirements and toxic levels to plants. In this context, the aim was to evaluate the effect of Ni in soil-plant system through experiment under controlled conditions, using soil pots distributed entirely at random, using a factorial 2 x 5, with seven repetitions each treatment. The first factor was formed of two saturations base (50 and 70%) and the second of five Ni rates (0, 0.1, 0.5, 1.0 and 10.0 mg dm<sup>-3</sup> of soil). The pots were filled with 8 dm<sup>3</sup> of soil and sown with soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] succeeded by sunflower (*Helianthus annuus* L.). The agronomic traits: plant height (PH), stem diameter (SD), number of nodes (NN), phenological stage (PS), SPAD index, head diameter (HD) (Sunflower) were evaluated at 30 and 60 days after emergence (dae) of each crop. Whole soybean plants, sampled in four pots of each treatment were collected at the R1 stage for analysis of soil samples from the rhizosphere. Then, the collected plants were divided into: sheets; roots (nodules on soybean) and shoot. Were determined in the leaves used for diagnosis in soybean and sunflower: macro and micronutrients, activities of nitrate reductase, and urease and concentrations of organic acids: oxalic, malonic, succinic, malic, tartaric, fumaric, oxaloacetic, citric and lactic. The same organic acids were determined in secondary roots of sunflower and nodules of soybean. They were conducted ultrastructural evaluations by means of transmission electron microscopy (TEM) in sunflower roots, and color in soybean nodules, using light microscopy. In the soil were determined: urease activity dehydrogenase, the total Ni and available by methods: Mehlich-1, Mehlich-3 and DTPA. At physiological maturity period of each culture was performed to harvest the plants of other pots in order to determine grain dry matter yield, Ni content in the whole plant and Ni and N content in grains. At the end of the two experiments it were carried out new soil sampling for Ni sequential extraction. The SPAD index taken on soybean leaves at 60 d.a.e., the dry matter production of the aerial part of soybean and sunflower root were influenced by the base saturation, nickel doses and the interaction among them. They were influenced by the saturation for base and nickel doses (single factor): soybean: HP d.a.e. to 60, NN at 30 and 60 d.a.e., SPAD to 30 d.a.e.; Sunflower: PH and NN at 30 and 60 d.a.e., HD and SPAD to 30 d.a.e. The other variables

assessed at 30 and 60 d.a.e. They were influenced only by base saturation, or Ni doses separately. Sunflower soybean plants had higher Ni contents at the different tissues (except grain) when grown under V50%. The production of soybean and sunflower grains was not affected by the treatments, but the N content of the soybeans was changed by Ni rates V70%. The urease enzyme activity in soybean and sunflower leaves was responsive to increased doses of Ni. Four of the organic acids and the N content in leaves and grains were higher in plants grown under V70% at the dose of  $0.5 \text{ mg dm}^{-3}$  Ni. Ni rates as well as the cation base saturation directly influenced the balance of plant nutrients. The Mehlich-1, Mehlich-3 and DTPA presented higher coefficient correlation between available Ni soil fraction with nutrient concentrations in both soybean and sunflower, with the DTPA solution showing the highest correlation coefficient in this analysis. Ni showed variable distribution among different soil fractions in the treatments. The treatments presented soil under cation bases saturation of 70% showed higher Ni concentration linked to carbonate, as compared to treatments under cation base saturation of 50%. The distribution of Ni between the soil fractions followed the following order: bound to carbonate <exchangeable < bound to oxides <organic matter <residual. The cation base saturation showed different effects on the urease activity according to the plant evaluated. Ni exerted on the differential effect dehydrogenase activity according to the plant specie.

**Keywords:** soybean. sunflower. micronutrients. plant nutrition. organic acids. enzymatic activity.

## Índice

Índice .....	13
INTRODUÇÃO.....	15
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA .....	17
Referências .....	20
CAPITULO II – DISPONIBILIDADE E FRACIONAMENTO DE NI E ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO SOLO .....	27
Resumo .....	27
Introdução.....	28
Material e métodos .....	30
Resultados e discussão .....	34
Conclusões.....	44
Referências .....	45
CAPÍTULO III – DOSES DE NÍQUEL E SATURAÇÕES POR BASES NO DESEMPENHO AGRONÔMICO DA SUCESSÃO SOJA E GIRASSOL.....	51
Resumo .....	51
Introdução.....	52
Material e métodos .....	53
Resultados e discussão .....	56
Conclusões.....	82
Referências .....	83
CAPITULO IV - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM TECIDOS DE SOJA E GIRASSOL SUBMETIDAS A SATURAÇÕES POR BASES E DOSES DE NÍQUEL .....	91
Introdução.....	91
Material e métodos .....	94
Resultados e discussão .....	97
Conclusões.....	112
Referências .....	112



## INTRODUÇÃO

O níquel (Ni) é o vigésimo segundo elemento mais abundante na crosta terrestre encontrado naturalmente nos solos em proporções que variam conforme o material de origem. Além da sua concentração natural, os solos recebem Ni oriundo da atividade antrópica por meio: da exploração agrícola dos solos com uso de insumos (pesticidas, corretivos e fertilizantes); uso de lodos de esgoto e escórias de siderúrgicas e; deposição atmosférica a partir combustíveis fósseis de atividades metalúrgicas industriais.

No contexto ambiental o Ni não tem suas funções completamente elucidadas. No âmbito dos microorganismos, existem catalogadas nove enzimas Ni-dependentes que apresentam funções relacionadas aos ciclos do carbono (C) e do nitrogênio (N). Acetil-coenzima A, hidrogenases e desidrogenases são algumas das enzimas que têm ganhado destaque no meio agrícola por apresentarem influência na relação simbiótica entre plantas e bactérias. Na nutrição mineral de plantas o Ni foi o último elemento a ser inserido na atual lista dos considerados essenciais e até recentemente a composição estrutural da molécula da urease, enzima que catalisa a hidrólise da ureia em amônia ( $\text{NH}_3$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), comum a todas as plantas superiores, constituía a única comprovação de sua essencialidade. Contudo, nem mesmo as funções da urease são completamente conhecidas. Estudos recentes com plantas de arroz, buscando novas comprovações da essencialidade do Ni no metabolismo vegetal, têm relatado a dependência das glioxalases I ao Ni, de modo que há o entendimento de que com o aprimoramento das técnicas analíticas e a purificação de reagentes, novas funções fisiológicas serão atribuídas a este micronutriente. Apesar da essencialidade comprovada e da perspectiva de futuros papéis do Ni nos organismos vivos, estudos com o elemento têm se concentrado na grande maioria em evidenciar seus efeitos tóxicos.

No solo apenas uma pequena proporção do conteúdo total de Ni está disponível às plantas. Essa disponibilidade é governada principalmente pelo pH. Nos últimos anos os avanços agrícolas proporcionaram entre outras: a popularização da prática da calagem, plantas mais produtivas (por consequência maior exportação de nutrientes) e a concentração de macronutrientes em formulações comerciais de adubos. Como efeito, alguns elementos que apresentavam concentrações no solo satisfatórias ao suprimento das plantas passaram a se tornar limitantes, como o caso do zinco e manganês na região dos cerrados.

São escassos os trabalhos que avaliam o comportamento do Ni nos solos sob condições tropicais e principalmente as respostas de culturas anuais quanto à aplicação de Ni em “doses nutricionais”. Sabendo-se que o Ni exerce influencia nos ciclos do C e N, na relação simbiótica planta/bactéria e que a disponibilidade desse elemento não tem sido monitorada nos solos sob clima tropical, se faz necessário avaliar a disponibilidade do Ni no sistema solo-planta, sobretudo, quanto ao ciclo do ácido cítrico e enzimas relacionadas ao N, em condições de cultivo nas quais as plantas são submetidas.

Objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito da aplicação de doses de níquel ao solo sob duas saturações por bases quanto aos aspectos fisiológicos e agronômicos das culturas da soja e girassol, bem como avaliar a disponibilidade, o seu fracionamento no solo e atividades enzimáticas.

## CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Embora seja considerado elemento traço, o níquel (Ni) encontra-se entre os metais pesados mais comuns em solos (BERTON et al., 2006). Existem consideráveis variações do seu conteúdo em função do material de origem, sendo maior o teor em solos desenvolvidos de serpentina e menor em solos derivados de granitos e arenito (MITCHELL, 1945; ADRIANO, 1986). Nos materiais orgânicos do solo, o níquel encontra-se formando complexos (CROOKE, 1956).

Além do Ni constituinte do material de origem, a atividade antrópica por meio de queima de combustíveis fósseis, atividades metalúrgicas, utilização de defensivos, adição de lodo de esgoto e fertilizantes (principalmente fosfatados), contribuem para o acréscimo do nutriente nos solos. Segundo Nriagu; Pacyna (1988), a adição global de Ni aos solos, anualmente varia na faixa de 200.000–550.000 kg. Essa alteração do teor natural tende a ser observada somente após décadas (MCBRIDE; SPIERS, 2001).

Os metais pesados estão presentes no solo em uma grande variedade de formas, cada uma delas com um grau de disponibilidade para as plantas e de mobilidade vertical no perfil do solo. Por isso, esforços têm sido feitos pelos pesquisadores no sentido de quantificar os metais compartimentados nas diferentes frações do solo (ROSS, 1994). O comportamento destes metais é controlado por atributos físicos, químicos e mineralógicos que definem suas diversas formas (solúvel, precipitado, complexado e adsorvido) (KABATA PENDIAS; PENDIAS; 2001; FONTES et al., 2001), sendo o fator mais importante que determina a distribuição de Ni entre a fase sólida e a solúvel do solo, o pH, no qual a disponibilidade deste elemento é diretamente relacionada com o potencial hidrogeniônico (UREN, 1992).

A absorção de metais pesados pelas plantas é muitas vezes, erroneamente correlacionada com suas concentrações totais nos solos (DUNEMANN et al., 1991). Rovers et al. (1983), estudando a ocorrência natural de Ni total e solúvel em solos do Estado de São Paulo, relataram que 34 amostras, das 38 analisadas, apresentaram teor de Ni solúvel (extrator DTPA) menor que  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ , ao passo que o total variou de 10 a  $127 \text{ mg dm}^{-3}$ . O fato de o metal pesado estar presente no solo não significa que esteja numa forma prontamente assimilável pelas plantas (SIMONETE; KIEHL, 2002). O sucesso do monitoramento depende, em parte, de um método químico eficiente para determinar a fração desses elementos colocada à disposição das plantas (MANTOVANI et al., 2004). Os metais contidos em um material sólido podem ser fracionados em formas geoquímicas específicas, e podem ser seletivamente extraídos pelo uso de reagentes apropriados (TESSIER et al., 1979).

Ao determinar a distribuição de um metal no solo, pode-se, ainda, lançar mão de melhores extratores (forma “disponível”) que removam elementos das mesmas frações que as plantas. Estudos desse tipo são incipientes no Brasil (BORGES; COUTINHO 2004).

Apesar dos estudos com Ni no solo concentrarem na grande maioria com os aspectos ambientais (MOLAS 2002), abordagens deste elemento referentes à nutrição mineral de plantas remontam do início do século passado, muito embora, em 1918 nos Estados Unidos, desordens nutricionais relatadas em pecan (*Carya illinoensis*) foram inicialmente atribuídas à viroses, deficiências de Mn, Cu e só recentemente aceitas como deficiência de Ni pelas plantas (WOOD et al., 2004). Cerca de 30 anos antes, Dixon et al., (1975) isolaram o Ni de moléculas de urease em feijão de porco (*Canavalia ensiformis* L.) e concluíram que esta se tratava de uma metaloproteína encontrada em diversos seres vivos, dentre eles, todas as plantas superiores. Na década seguinte Brown et al., (1987) verificaram que plantas de cevada, cultivadas por três ciclos subsequentes utilizando sementes oriundas da geração anterior usando solução nutritiva “ultra pura” com ausência de Ni, não germinaram. Com isso, somado aos estudos de Esken et al. (1983) que verificaram a importância do Ni no ciclo do nitrogênio (N), indiferente da fonte de N aplicada, o Ni passou a ser classificado como micronutriente, conferindo sua essencialidade às plantas por meio do critério direto de (ARNON; STOUT 1939).

Até recentemente, a composição estrutural da molécula da urease (EC 3.5.1.5), enzima que desdobra a ureia hidroliticamente em amônia (NH<sub>3</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) constituía a única comprovação de sua essencialidade (POLACCO et al., 2013). Contudo, Mustafiz et al. (2014) em trabalho com a cultura do arroz (*Oriza sativa*) verificaram a Ni-dependência das glioxalases I para obtenção de sua máxima atividade, confirmando a premissa de Brown (2007) que apontava para futuras descobertas de novos papéis do Ni na fisiologia das plantas. Largamente estudadas no âmbito das bactérias, enzimas Ni-dependentes como acetil-coenzima A, hidrogenases e desidrogenases (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA 2006; KÜPPER; KRONECK 2007; CHEN et al., 2009; BOER et al., 2014), tem ganhado destaque no contexto agrícola por apresentarem influência na relação simbiótica entre plantas e bactérias (POLACCO et al., 2013). Com o aprimoramento das técnicas laboratoriais e a purificação dos reagentes, novas funções são atribuídas ao Ni. Desguin et al. (2015) demonstraram que a racemase lactato (Lar), enzima que converte em D e L isômeros do ácido láctico (enzima presente em bactérias) também utiliza-se de Ni como cofator, aumentando para nove o número de enzimas Ni-dependentes para plantas e/ou microrganismos (BOER et al., 2014).

No solo o Ni é pronta e rapidamente absorvido pelas plantas na forma de Ni<sup>2+</sup> (ADRIANO, 2001), se desloca via xilema na forma iônica ou pode ser complexado com ácidos orgânicos (cítrico e málico) (YANG et al., 1997) em meio com valores pH > 5, ou um grupo de aminoácidos como a histidina em meio com valores pH > 6,5 (BROWN, 2006) mas também é móvel no floema e em casos de deficiência, de modo que sua redistribuição ocorre de forma rápida (MISHRA; KAR, 1974). Aparentemente sua absorção se dá pelos mesmos sítios de absorção do Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, podendo ocorrer efeito interiônico de inibição competitiva (TIFFIN, 1971, KÖRNER et al., 1987, UREN, 1992) de maneira que a reação do solo exerce grande influência na disponibilidade do Ni (McGRATH et al., 1995). Também são relatados dois sistemas de transporte: baixa afinidade e alta afinidade. Com o sistema de transportes de baixa afinidade, as plantas podem extrair Ni<sup>2+</sup> em concentrações da ordem de 4,4 ppb ao passo que com o sistema de transporte de alta afinidade, as plantas podem transportar até 1,8 ppm de Ni<sup>2+</sup> (BROWN, 2006).

Embora não existam relatos da deficiência de Ni em condições tropicais, a literatura apresenta como tal o impedimento da ação da urease, levando ao acúmulo de uréia que causam manchas necróticas nas folhas que em condições severas, devido a aparência, esses sintomas ficaram conhecidos como “orelha de rato”. Em detrimento ao Ni, o metabolismo de ureídeos, aminoácidos e de ácidos orgânicos é perturbado de modo que os ácidos oxálico e málico se acumulam na extremidade das folhas (WOOD et al., 2004; BAI et al., 2006). Esses fatos sugerem que o Ni possa exercer múltiplos papéis nas plantas, muito embora, nem mesmo as funções das ureases são completamente conhecidas (POLACCO et al., 2013). As manchas necróticas, associadas com a deficiência, coincidem com locais de acúmulo de uréia e dos ácidos oxálico e láctico, o que indica também mudanças no metabolismo do carbono (C), no qual o Ni está relacionado em outros organismos (RAGSDALE, 2007).

Já a fitotoxicidade do Ni é resultado de sua ação no fotossistema, causando distúrbios no ciclo de Calvin e inibição do transporte de elétrons por causa das quantidades excessivas de ATP e NADPH acumuladas pela ineficiência das reações de escuro (KRUPA et al., 1993). Outros relatos de fitotoxicidade descritos na literatura são: interferência na absorção de nutrientes (CROOKE; INKSON, 1955); redução na produção de sementes (PICCINI; MALAVOLTA 1992); diminuição da concentração de clorofila em folhas de café (PAVAN; BUIGHAM, 1982); de milho (BACCOUCH et al., 1998); concentração de Ni em grãos (de feijão) a níveis inapropriados para consumo (BERTON et al., 2006).

A interferência da aplicação de Ni sobre a nutrição das plantas faz-se de modo diferenciado com o nutriente e com a espécie vegetal, podendo apresentar efeitos antagônicos,

sinérgicos e independentes, ou ainda ser neutros. Em termos de tolerância ao excesso de Ni, pode-se dizer que as espécies apresentam comportamento distinto, devendo ser ressaltado que algumas espécies consideradas hipertolerantes ao elemento conseguem sobreviver e desenvolver-se em ambientes com alto teor do elemento como os solos de serpentina (GHASEMI et al., 2014), ao passo que outras apresentam alta sensibilidade, não suportando as condições adversas (PAIVA et al., 2002).

Por fim, o Ni no solo não afeta somente as plantas, Ploskonka; Niklinska (2013) verificaram redução da respiração microbiana do solo em resposta a adição de Ni. Dalton et al. (1985) constataram aumento na atividade da urease que, segundo Milosevic et al. (2002), ocorre em função da seleção de microorganismos produtores desta enzima, sendo observado que a biomassa microbiana do solo decresceu em função das doses de Ni. Val et al. (1999) afirmam que fungos micorrízico-arbusculares (FMA) são os mais afetados pela adição de metais e Berton et al. (2006) afirmaram que o desempenho destes organismos no solo são fundamentais para o estabelecimento e sobrevivência de muitas plantas, tanto em condições de solos naturais quanto em áreas degradadas.

Ureta et al. (2005) demonstraram que baixo teor de Ni nos solos agrícolas pode limitar a atividade da hidrogenase simbiótica de *Rhizobium leguminosarum*, pois, microorganismos muitas vezes necessitam de Ni em quantidades muito maiores que as plantas e nem sempre a concentração natural no solo é suficiente (POLACCO et al., 2013) Verifica-se, portanto, que estudos do comportamento do Ni na planta devem alcançar especificidades bioquímicas e fisiológicas sem, contudo, deixar de abranger as relações solo-planta que governam a disponibilidade deste elemento, bem como a capacidade das plantas em absorvê-lo.

## Referências

ADRIANO, D. C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York, Springer, 1986.

ADRIANO, D. C. **Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals**. 2. ed. New York: Springer, 2001.

ARNON, D. I.; STOUT, P. R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. **Plant Physiology**, Rockville, v. 14, p. 371-375, 1939.

BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity: effects on growth and metabolism of maize. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, p. 577-588, 1998.

BAI, C.; REILLY, C. C.; WOOD, B. W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 433-443, 2006.

BERTON, R. S.; PIRES, A. M. M.; ANDRADE, S. A. L.; ABREU, C. A.; AMBROSANO, E. J.; SILVEIRA, A. P. D. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.1305-1312, 2006.

BOER, J. L.; MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel-dependent Metalloenzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Lansing, v. 0, p. 142-152, 2014.

BORGES, M. R.; COUTINHO, E. L. M. Metais pesados do solo após a aplicação de biossólido. II. Disponibilidade. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 557-568, 2004.

BROWN, P. H. Nickel. In: BARKER, A.V.; PILBEAN, D. J. (Eds). **Handbook of plant nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 395-402.

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

CHEN, C.; HUANG, D.; LIU, J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. **Clean-Soil Air Water**, Hoboken, v. 37, p. 304–313, 2009.

CROOKE, W. M.; INKSON, R. H. E. Relation between nickel toxicity and major nutrient supply. **Plant and Soil**, Dordrecht v. 6, p. 1-15, 1955.

CROOKE, W. M. Effect of soil reaction on uptake of nickel from a serpentine soil. **Soil Science**, Baltimore, v. 81, p. 269-276, 1956.

DALTON, D. A.; EVANS, H. J.; HANNIS, 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**, Dordrecht, v. 88, p. 245–258, 1985.

DESGUIN, B.; ZHANG, T.; SOUMILLION, P.; HOLS, P.; HU, J.; HOUSINGER, R. P. A. Tethered niacin-derived pincer complex with a nickel-carbon bond in lactate racemase. **Science**, Washington, v. 349, p. 66-69, 2015.

DIXON, N. E.; BLAKELEY R. L.; ZERNER. R. Jack-Bean urease (EC 3.5.1.5.3.). III. The involvement of active site Ni ion in inhibition by b-mercaptoethanol and phosphoramidate, and fluoride. **Canadian Journal Biochemistry**, Ottawa, v. 58, p. 481-488, 1980.

DUNEMANN, L. N.; WIREN, R.; SCHULZ, H.; MARSCHNER, H. Speciation analysis of nickel in soil solutions and availability to oat plants. **Plant and Soil**, Dordecht, v. 133, p. 263-269, 1991.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel and essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. **Science**, Washington, v. 222, p. 691-693, 1983.

FONTES, M. P. F.; CAMARGO, O. A.; SPOSITO, G. Eletroquímica das partículas coloidais e sua relação com a mineralogia de solos altamente intemperizados. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 627-646, 2001.

GHASEMI, R.; CHAVOSHI, Z. Z.; BOYD, R. S.; RAJAKARUNA, N. A preliminary study of the role of nickel in enhancing flowering of the nickel hyperaccumulating plant *Alyssum inflatum* Nyár. (*Brassicaceae*). **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 92, p. 47-52, 2014.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3. ed. Boca Raton, CRC Press, 2001. 413p.

KÖRNER, L. E.; MØLLER, I. M.; JESÉN, P. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and other divalent cations on uptake of  $\text{Ni}^{2+}$  by excised barley roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 49-54, 1987.

KRUPA, Z.; OQUIST, G.; HUNER, N. P. A. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*: a fluorescence analysis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, p. 626-630, 1993.

KÜPPER, H.; KRONECK, P. M. H. Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. In: SIGEL, A; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. (Eds). **Metal ions in life sciences**, Hoboken: Wiley, 2007. v. 2, p. 31–62.

MANTOVANI, J. R.; CRUZ, M. C. P.; FERREIRA, M. E.; ALVES, W. L. Extratores para avaliação da disponibilidade de metais pesados em solos adubados com vermicomposto de lixo urbano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 371-378, 2004.

McBRIDE, M. B.; SPIERS, G. Trace element content of selected fertilizers and dairy manures as determined by ICP-MS. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 139-156, 2001.

McGRATH, S. P.; CHAUDRI, A. M.; GILLER, K. E. Long term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. **Journal of Industrial Microbiology**, Basingstoke, v. 14, p. 94-104, 1995.

MILOSEVIC, N.; GOVEDARICA, M.; KASTORI, R.; PETROVIC, N. Effect of nickel on wheat plants, soil microorganisms and enzymes. **Studia Universitatis Babeş-Bolyai. Biologia**, Bolyai, v. 47, p. 79-84, 2002.

MITCHELL, R. L. Cobalt and nickel in soils and plants. **Soil Science**, Baltimore, v. 60, p. 63-70, 1945.

MISHRA, D.; KAR, M. Nickel in plant growth and metabolisms. **Botanical Review**, New York, v. 40, p. 395-449, 1974.

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**, Kidlington, v. 47, p. 115–126, 2002.

MUSTAFIZ, A.; GHOSH, A.; TRIPATHI, A. K.; KAUR, C.; GANGULY, A. K.; BHAVESH, N. S.; TRIPATHI, J. K.; PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; SINGLA-PAREEK, S. L. A unique Ni<sup>2+</sup>-dependent and methylglyoxal-inducible rice glyoxalase I possesses a single active site and functions in abiotic stress response. **Plant Journal**, Oxford, v. 78, p. 951-963, 2014.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. **Nature**, London, v. 333 p. 134-139, 1988.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Teor de nutrientes em mudas de cetro (*Cedrella fissilis* Vell.) submetidas a doses crescentes de níquel, em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, p. 279-284, 2002.

PAVAN, M. A.; BINGHAM, F. T. Toxidez de metais pesados em plantas. II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 323-328, 1982.

PICCINI, D. F.; MALAVOLTA, E. Effect of nickel on two common bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 15, p. 2343-2350, 1992.

PLOSKONKA, J. M.; NIKLINSKA, M. Effects of soil moisture and nickel contamination on microbial respiration rates in heavy metal-polluted soils. **Polish Journal of Environmental Studies**, Krakow, v. 22, p. 1411-1418, 2013.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. **Plant Science**, Shannon, v. 199–200, p. 79–90, 2013.

RAGSDALE, S. W. Nickel and the carbon cycle. **Journal Inorganic Biochemistry**, New York, v. 101, p. 1657–1666, 2007.

ROSS, S. M. Retention, transformation and mobility. In: ROSS, S. M. (Ed.). **Toxic metals in soil-plant systems**. New York: Wiley, 1994. p.94-139.

ROVERS, H.; CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S. Níquel total e solúvel em DTPA em solos do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 7, p. 217-220, 1983.

SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, p. 285–308, 2006.

SIMONETE, M. A.; KIEHL, J. C. Extração e fitodisponibilidade de metais em resposta à adição de lodo de esgoto no solo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p. 555-563, 2002.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G. C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, Washington, 51:844- 851, 1979.

TIFFIN, L.O. Translocation of nickel in xylem exudates of plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 48, p. 273-277, 1971.

UREN, N. C. Forms, reaction and availability of nickel in soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 48, p. 141-203, 1992.

URETA, A. C.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; PALACIOS, J. M. *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae symbiotic hydrogenase activity and processing are limited by the level of nickel in agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7603-7606, 2005.

VAL, C.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.11, p.261-269, 1999.

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

YANG, W. E.; BALIGAR, V. C.; FOSTER, J. C.; MARTENS, D. C. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize grown with different nickel levels. **Plant and Soil**, Dordecht, v. 196, p. 271-276, 1997.



## CAPITULO II – DISPONIBILIDADE E FRACIONAMENTO DE NI E ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO SOLO

### Resumo

A concentração de níquel (Ni) no solo interfere no desenvolvimento de plantas e microorganismos que nele habitam. A disponibilidade de Ni para esses seres variam de acordo com a interação do elemento com as frações do solo. Conhecer as formas químicas em que o Ni se apresenta, prever sua fração disponível às plantas e microorganismos, bem como, monitorar a atividade de enzimática do solo sob as saturações por bases mais empregadas para as culturas anuais pode se tornar uma ferramenta auxiliar na valiação da fertilidade do solo e do estado nutricional. Objetivou-se com esse estudo avaliar a atividade das enzimas urease e desidrogenase no solo, determinar as frações de Ni no solo, bem como estabelecer extratores para previsão da fração fitodisponível. O trabalho constou de dois experimentos realizados em vasos, em esquema fatorial 2 x 5, sendo duas saturações por bases (V50 e V70%) e cinco doses de Ni (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; e 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni), com sete repetições. Foram cultivadas plantas de soja (primeiro experimento) seguidas de girassol (segundo experimento) sob os mesmos tratamentos. Por ocasião do estádio R1 (para as duas culturas) quatro vasos de cada tratamento foram retirados para coleta de folhas diagnósticas e amostras solo superficial e de rizosfera. As plantas dos três vasos restantes foram cultivadas até o estádio fenológico R7 quando foram coletadas amostras de solo para fracionamento do Ni. Nas amostras de folha e solo coletadas no estádio R1 foram determinados os teores Ni total nas folhas e teores disponíveis de Ni no solo, utilizando os extratores Mehlich-1, Mehlich-3 e DTPA. Nas amostras de solo coletadas no estádio R7, foi realizada extração sequencial de Ni. Os extratores Mehlich-1, Mehlich-3 e DTPA apresentaram alto coeficiente de correlação entre a fração de Ni disponível no solo e a concentração do elemento nas folhas de soja e girassol, sendo o extrator DTPA o que apresentou maior coeficiente de correlação para este estudo. O Ni apresentou distribuição variável entre as diferentes frações do solo em função dos tratamentos. Os tratamentos que apresentaram solo com saturação por bases de 70% apresentaram maior concentração de Ni ligado a carbonato, comparado aos tratamentos sob saturação por bases de 50%. A distribuição do Ni entre as frações do solo seguiu a seguinte ordem: ligado a carbonato < trocável < ligado a óxidos < matéria orgânica < residual. A saturação por bases exerceu efeito diferenciado sobre atividade da urease em função da espécie avaliada; enquanto o Ni exerceu efeito diferenciado na atividade de desidrogenase, em função da planta estudada.

## Introdução

Os metais pesados são definidos como elementos com densidade maior que  $5 \text{ g cm}^{-3}$  e estão naturalmente presentes em rochas, geralmente, em baixas concentrações. São responsáveis por causar impactos negativos aos ecossistemas e seres vivos, principalmente os seres humanos. Entretanto, a exigência mesmo que em pequenas proporções pela planta tende a restringir o desenvolvimento do vegetal quando a disponibilidade é inferior a exigência da cultura (Lei do mínimo, de Sprengel e Liebig). Muitos desses elementos são micronutrientes como o níquel (Ni), exigidos em baixas concentrações para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias a seres humanos, podendo, sua deficiência, provocar sérios problemas, como a limitação da produção agrícola. A quantidade de sistemas biológicos dependentes do níquel é muito menor em relação a outros metais, tais como ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn). Porém, o pequeno número de biomoléculas contendo Ni encontrado nos sistemas vivos é compensado pela variedade de funções que estas moléculas desempenham (NAKAGAKI et al., 2006).

O Ni é um elemento encontrado na composição da maioria das rochas da crosta terrestre e está entre os metais pesados mais comuns em solos. Nas rochas, as concentrações variam de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  nas metamórficas (serpentinita) a  $1200\text{-}2000 \text{ mg kg}^{-1}$  em rochas ultrabásicas (dunita, periodotita). Nas eruptivas básicas (basalto, gabro) o teor de Ni é mais elevado que nas eruptivas ácidas (granito), da ordem de  $150$  e  $5\text{-}10 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Em rochas sedimentares o teor de Ni varia de  $2$  a  $70 \text{ mg kg}^{-1}$ . No solo, a concentração de Ni varia em função do material de origem e da intensidade da atividade antrópica, em solos de todo o mundo a média é de  $20\text{-}40 \text{ mg kg}^{-1}$  do elemento, contudo, em solos oriundos de serpentina os valores podem variar de  $100$  a  $7000 \text{ mg kg}^{-1}$  (ADRIANO, 1986).

O fator mais importante que determina a distribuição de Ni entre a fase sólida e a solúvel do solo é o pH, de modo que a disponibilidade de Ni está inversamente relacionada com o potencial de ionização do hidrogênio (UREN, 1992). A sorção do Ni em óxidos de Fe e Mn é especialmente dependente do pH, provavelmente devido a forma  $\text{NiOH}^+$  ser preferencialmente sorvida e também porque a carga de superfície dos sorventes é afetada pelo pH (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1992). No Brasil não existem níveis críticos para o Ni nos solos agrícolas e o controle do pH não é realizado de forma direta uma vez que, os métodos de calagem visam estabelecer valores ideais de saturações por bases para cada cultivo, essa prática consequentemente eleva o pH do solo. Contudo, o Ni ligado à carbonatos ( $\text{NiCO}_3$  e  $\text{NiCO}_3^{3+}$ ) são solúveis e susceptíveis a absorção e lixiviação (PIERRISNAR, 1996), tornando-se mais um fator a ponderado quanto a disponibilidade do Ni.

De acordo com Uren (1992), cerca de 0,001% do Ni total do solo, está na solução do solo, em capacidade de campo, de modo que o restante está distribuído entre as fases orgânicas insolúveis e inorgânicas, dentro de cada uma dessas frações pode haver fases oclusas como adsorvidas. Desse modo, a concentração total do Ni no solo não apresenta proporcionalidade quanto ao seu acúmulo por plantas. A variação da espécie cultivada também difere quanto à sua capacidade de absorver o elemento. A disponibilidade de Ni é regulada, em grande parte, pelas reações de adsorção que ocorrem entre o elemento e as superfícies sólidas do solo. Essas reações são influenciadas pela capacidade de troca de cátions (CTC), pH, teor de argila e matéria orgânica (MO) no perfil, superfície específica, teor de óxidos, entre outras (SCHEIDEGGER et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2005).

O sucesso do monitoramento de metais pesados no solo consiste em parte, de um método químico eficiente para determinar a fração desses elementos colocada à disposição das plantas (MANTOVANI et al., 2004). Para estes estudos têm sido utilizados diversos extratores químicos, cuja eficiência é atribuída de acordo com o grau de correlação entre quantidades extraídas do solo e quantidades absorvidas pelas plantas (KIEKENS; COTTENIE, 1985).

Entre os extratores universais mais utilizados no diagnóstico da disponibilidade de elementos no solo estão DTPA, Mehlich-1 e Mehlich-3 (RAIJ, 1994), de modo que este primeiro é adotado por diversos programas de proficiência que regulamentam e padronizam as análises de solos pelo país. Consiste em um solução básica de trietanolamina, DTPA e cloreto de cálcio. Já o Mehlich-1 é uma solução diluída de ácidos fortes (HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e, o Mehlich-3 é constituído de uma solução de fluoreto de amônio, EDTA, nitrato de amônio e os ácidos acético e nítrico.

A biodisponibilidade e a mobilidade de metais no solo não depende só da sua concentração na solução e sim da natureza da associação com outras espécies iônicas solúveis e da capacidade do solo em fornecê-lo para solução em resposta à absorção pelas plantas. Para prever o destino dos metais pesados no solo, é imprescindível o conhecimento de suas principais formas e prováveis transformações no ambiente (BECKETT, 1989). Os metais contidos em um material sólido podem ser fracionados em formas geoquímicas específicas, e podem ser seletivamente extraídos pelo uso de reagentes apropriados (TESSIER et al., 1979). Uma técnica que tem sido utilizada para definir a proporção do metal associado a cada componente da fase sólida dos solos é a extração sequencial ou fracionamento de metais (MATTIAZZO et al., 2001).

Por se tratar de um metal pesado seus efeitos extrapolam o acúmulo nas plantas de modo que o tipo de solo, cobertura vegetal e a concentração de metal pode influenciar diretamente na atividade dos microorganismos (WYSZKOWSKA et al., 2005). Milosevic et al. (2002), ao trabalharem com doses de Ni para cultura do trigo, observaram alterações na microbiota do solo. Andrade et al. (2004) afirmaram que quando os organismos do solo realizam simbiose com as culturas, esta associação é sensivelmente afetada pela presença de metais pesados. Para avaliação de seus efeitos no ambiente, em geral, têm sido utilizados métodos que quantificam seu impacto sobre a quantidade e diversificação da microbiota do solo, suas atividades (produção de enzimas, respiração, etc), bem como a rota de acúmulo do metal nas frações do solo. Os papéis mais importantes das enzimas no bioma solos estão relacionados as oxireduções (por meio de desidrogenases e catalases) e as hidrólises (por meio de arilsulfatases, ureases, fosfatases, entre outras). Como o Ni é componente da urease, e esta enzima é produzida por plantas e microorganismos, se torna ferramenta importante no monitoramento deste elemento. Kucharski et al. (2009) avaliaram uma série de enzimas nos solo e identificaram urease e desidrogenase como as mais sensíveis a variação de Ni.

Observa-se que para verificar o monitoramento de um elemento no sistema solo-planta é necessário lançar mão de vários métodos que evidenciem e quantifiquem sua presença no sistema, para assim prever o seu comportamento no ambiente agrícola. Ressalta-se que no Brasil não existem valores de níveis críticos conhecido para o Ni para solos e plantas. Neste contexto, conhecer as formas químicas em que o Ni se apresenta no solo bem como prever sua fração disponível às plantas sob as saturações por bases mais empregadas para as culturas anuais se torna imprescindível.

Objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito do Ni sob a atividade das enzimas urease e desidrogenase bem como quantificar o elemento nas frações de Ni no solo e estabelecer extratores para previsão da fitodisponibilidade do Ni.

## **Material e métodos**

### *Descrição do experimento*

O experimento foi desenvolvido em vasos com capacidade de 10 dm<sup>3</sup>, em casa de vegetação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no município de Piracicaba – SP, localizado a 22°43'12"S e 47°38'54"O, com 580 m de altitude. Para preenchimento dos vasos foram utilizadas amostras coletadas da camada de 0 – 20 cm de um Nitossolo coletado

na área experimental da Agencia Paulista de Tecnologia e Agronegócios (APTA) unidade de Piracicaba – SP.

Para alcançar os objetivos do experimento foram utilizados 70 vasos distribuídos inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2 x 5, com sete repetições cada tratamento. O primeiro fator foi constituído de duas saturações por base 50 e 70%, e o segundo constituiu de cinco doses de Ni (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de solo); os vasos foram cultivados com soja e sucedidos por girassol.

### *Desenvolvimento do experimento*

#### *Cultivo da soja*

Em agosto de 2012, foi coletado o volume de terra suficiente para preenchimento dos 70 vasos. Após o peneiramento desta, uma amostra representativa foi coletada para realização da análise de rotina e determinação da densidade. As características físico-químicas da terra (TFSA) foram: argila 513± 13; silte 202± 24; areia 285± 35 pH (CaCl<sub>2</sub>) 5± 0,15; matéria orgânica 40± 2,52 g dm<sup>-3</sup>; P (resina) 20± 2,00 mg dm<sup>-3</sup>; K 2,9± 0,26 mmolc dm<sup>-3</sup>; Ca 33± 0,00 mmolc dm<sup>-3</sup>; Mg 10± 0,58 mmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al 53± 5,51 mmolc dm<sup>-3</sup>; Al 1± 0,58 mmolc dm<sup>-3</sup> Ni (DTPA) 0,04± 0,00 mg dm<sup>-3</sup>. Com base nos dados obtidos procedeu-se o preenchimento dos vasos com massa de 8,8 kg/vaso (equivalente a 8 dm<sup>3</sup> de terra, uma vez que a densidade do solo foi de 1,1 kg dm<sup>-3</sup>). Simultaneamente ao preenchimento, foi realizada a calagem individualmente, seguindo o método de saturação por bases utilizando a mistura física de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e carbonato de magnésio (MgCO<sub>3</sub>) na proporção 3:1 M na dosagem necessária para atender cada tratamento.

A semeadura da soja foi realizada no início de dezembro utilizando-se a cultivar Codetec 202. A inoculação foi realizada conforme método preconizado por Hungria et al., (2001) utilizando-se bactérias *B. japonicum* estirpe Semia 5079. A adubação de manutenção seguiu método preconizado por Malavolta et al. (1980), de modo que cada vaso recebeu respectivamente: P-200; K-150; Ca-75; Mg-15; S-50; B-0,5; Cu-1,5; Fe-5; Mo-0,1; Zn-5; em ppm de cada elemento e utilizando-se como fertilizantes matérias primas de uso laboratorial p.a. para evitar contaminação. O N foi suprimido da adubação para estimular a simbiose. O Ni foi aplicado por meio de solução estoque 2,7 mmol L<sup>-1</sup> utilizando-se sulfato de níquel hidratado (NiSO<sub>4</sub> • 6H<sub>2</sub>O), de acordo com cada tratamento.

### *Variáveis avaliadas*

Por ocasião do florescimento (estádio fenológico R1) foram coletadas: plantas inteiras de quatro vasos de cada tratamento. Nas plantas coletadas foram separados em folhas utilizadas para diagnose – 3º trifólio completamente aberto a partir do ápice da haste principal, seguindo recomendação de Malavolta et al. (1997); nódulos, raízes e parte aérea. Também no estágio R1 foram coletadas amostras de solo de rizosfera seguindo o método preconizado por Silva et al., (2002) No estágio R7, foi realizada a colheita das plantas dos vasos restantes (três por tratamento) para avaliação dos grãos. Nas frações das plantas descritas acima foram determinados os teores de Ni conforme método apresentado no Capítulo II.

### *Cultivo do girassol*

Após a retirada das plantas de soja e devido as coletas de amostras de solo necessárias para análises, o volume de terra dos vasos foi redimensionando para 7 dm<sup>3</sup> por vaso, preenchidos portanto com 7,7 kg de terra. Em seguida, foi semeado o girassol (híbrido HB29), seguindo os mesmos tratamentos. Além das sementes de girassol, foram acrescentados aos vasos somente a adubação de manutenção para cultura semelhante aquela descrita para soja acrescida de 300 ppm de N (1,98 g/vaso, aplicado 0,5 g por ocasião da semeadura na forma de nitrato de cálcio e o restante em duas coberturas - 1,0 + 0,48 g - na forma de ureia), conforme Malavolta et al. (1989).

Os procedimentos de coleta de solo e plantas no estágio R1 e por ocasião da colheita foram semelhantes aos efetuados na soja. No período de maturação do girassol (R9) foram colhidas as três plantas restantes de cada tratamentos e, foram coletadas novas amostras de solo representativas dos vasos para realizar extração sequencial de Ni.

### *Análises laboratoriais*

Nas amostras de solo de rizosfera foram avaliados os teores de Ni total e disponíveis bem como a atividade das enzimas urease e desidrogenase. Os teores totais de Ni foram obtidos por meio de digestão ácida (HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HCl) (USEPA, 1996), enquanto os teores disponíveis foram avaliados pelos extratores DTPA, conforme método preconizado por Lindsay; Norwell (1978); Mehlich-1, conforme método preconizado por Delfelipo; Ribeiro (1981) e Mehlich-3 conforme método preconizado por Mehlich (1984).

A taxa de hidrólise da uréia, que se dá função da atividade da urease, foi determinada seguindo o método de May; Douglas (1976), modificado por Longo et al. (1991) e adotado por Longo; Melo (2005). Foram utilizados 3,0 g de solo seco com 0,5 mL de tolueno e 12,0 mL de água deionizada; em seguida, incubou-se a 30° C por 10 min e adicionou-se 3 g L<sup>-1</sup> de uma solução de uréia. Incubou-se por mais 1 h, e adicionaram-se 15 mL de solução de KCl 2 mol L<sup>-1</sup>, com 5 mg de acetato de fenil mercúrio; seguido de agitação por 5 min e filtração. No filtrado, determinou-se o teor de N-amoniaco trocável, fazendo-se uso do método de destilação a vapor (BREMNER; KEENEY, 1965). Para cada tratamento, utilizou-se um branco, da maneira acima descrita, porém adicionando-se a solução de uréia após a solução de KCl + acetato de fenil.

A atividade de desidrogenases foi obtida pelo método proposto por Casida Jr. (1977) no qual o cloreto de trifeniltetrazólio foi utilizado como receptor artificial de elétrons sendo reduzido pela ação da enzima formando trifeniltetrazolio formazan, mensurado de forma indireta no comprimento de onda de 485 nm em espectrofotômetro.

Na amostra de solo coletada por ocasião da colheita do girassol foram realizadas análises de Ni nas diferentes frações do solo, por meio de extração sequencial. O fracionamento consistiu de extrações em sequência: I) a primeira, com MgCl<sub>2</sub> (1,0 mol L<sup>-1</sup>) a pH 7,0 para extrair o metal solúvel e trocável; II) a segunda, com NaOAc (1,0 mol L<sup>-1</sup>) a pH 5,0 para extrair, preferencialmente, o Ni adsorvido a superfície; III) a terceira, com NaOCl a pH 8,5 para extrair Ni ligado a matéria orgânica; IV) a quarta, com ácido oxálico (0,2 mol L<sup>-1</sup>) + NH<sub>4</sub> oxalato (0,2 mol L<sup>-1</sup>) a pH 3 para extrair Ni ligado a óxidos de Fe cristalino; e V) a quinta extração, para quantificar a fração residual, as amostras foram digeridas com HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HCl. Os procedimentos específicos referentes à cada etapa foram efetuados conforme metodologia proposta por Silveira et al. (2006).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. Nos casos em que o teste F foi significativo a 1 ou 5% de probabilidade, foi aplicado teste de médias a 5% de probabilidade, utilizando o esquema fatorial. Quando não ocorreu interação entre os fatores foi realizado o teste de médias para doses de Ni em cada variável do primeiro fator (saturações por bases). Também foram realizadas análises de correlações entre o Ni recuperado pelos extratores e a concentração de Ni nas folhas diagnósticas. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS - *System for Windows* 6.11 (SAS Inst., 1996).

## Resultados e discussão

### *Extratores*

A capacidade de recuperação de Ni por cada extrator foi baseada na capacidade destes em extrair o metal em comparação à quantidade de Ni obtida na fração total realizada pelo método USEPA (1996) em cada tratamento na mesma data de coleta. Os extratores apresentaram comportamentos distintos quanto à recuperação de níquel em função das doses aplicadas, das saturações por bases e da interação destes fatores. Nas menores doses de Ni aplicadas (0 e 0,1 mg dm<sup>-3</sup>) os valores recuperáveis pelos extratores embora não tenham apresentado diferenças entre as saturações por bases, proporcionalmente em relação o Ni total, a maior recuperação do metal foi observada nos solos cultivados com soja e girassol sob saturação por bases de 70% (Tabela 1). Na comparação entre os extratores, para o tratamento controle, o Mehlich-3 recuperou maior quantidade de Ni do solo.

A proporcionalidade de Ni disponível também foi variável em função da concentração total do elemento no solo. Verifica-se que nas menores doses de Ni aplicadas e, por consequência, menores teores totais de Ni no solo, cerca de 1 a 5% do Ni total estava disponível (foi recuperado pelos extratores) às plantas, ao passo que na maior dose de Ni aplicada, em alguns casos, como na dose de 10 mg dm<sup>-3</sup> de Ni e V50% para soja e girassol, os extratores DTPA e Mehlich-3 recuperaram respectivamente valores acima de 10% e 30% do total de Ni do solo. Também foi observada grande discrepância entre os extratores quanto à capacidade de recuperação de Ni sob condições semelhantes. No cultivo de soja sob saturação por bases de 50%, a recuperação de Ni pelo extrator Mehlich-1 variou de 0,0615 a 4,5068 mg kg<sup>-1</sup> de Ni entre as doses de 0 e 10 mg dm<sup>-3</sup> de Ni, já o extrator Mehlich-3 apresentou variação de 0,1084 a 2,8755 mg kg<sup>-1</sup> de Ni enquanto o DTPA oscilou entre 0,0652 e 6,2593 mg kg<sup>-1</sup> de Ni. Solos cultivados com girassol na dose de 0,5 mg dm<sup>-3</sup> de Ni nas duas saturações por bases avaliadas apresentaram disponibilidade de Ni em torno de 2% a 4% do total contido no solo de acordo com os extratores Mehlich-1 e 3, enquanto o extrator DTPA apresentou disponibilidade do elemento variando entre 5 a 15% sob mesmas condições, o que nos remete a necessidade de obter curvas de calibração específicas para cada extrator, tipo de solo, planta e condição de cultivo.

De modo geral, os extratores recuperaram mais Ni nos solos que receberam 10 mg dm<sup>-3</sup> de Ni sob saturação por bases de 50%. Apenas os extratores Mehlich-3 para soja e DTPA para girassol não foram influenciados pelas saturações por bases e pela interação entre doses de Ni e saturações por bases. Os extratores não apresentaram diferenças entre as quantidades recuperáveis de Ni nas quatro primeiras doses de Ni aplicadas (0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg dm<sup>-3</sup>),

diferindo somente da dose máximo de Ni aplicada, exceção apenas para Mehlich-1 e DTPA que apresentaram recuperações variáveis entre as doses de Ni aplicadas.

A capacidade de recuperação do Ni pelos extratores neste trabalho foi muito maior que os valores apresentados na literatura para condições tropicais. Rovers et al. (1983) verificaram que menos de 0,5% do Ni contido nos solos do Estado de São Paulo foi recuperado pelo extrator DTPA. Valores muito baixos de Ni disponível também foram obtidos por Rodak et al. (2015), utilizando-se dos extratores Melich-3 e DTPA para solos de todo o Brasil, ao passo que Uren (1992) afirmou que em média apenas 0,001% do Ni total contido no solo está disponível às plantas. Contudo, estes trabalhos realizaram amostragens convencionais de solo semelhantes as recomendadas por Raij et al. (1997) e Souza; Lobato (2004) de modo que este tipo de amostragem pode subestimar a quantidade de Ni disponível as plantas sendo necessário realizar coletas mais próximas as raízes como as coletas de solos de rizosfera preconizadas por Silva et al. (2002).

Essa premissa pode ser confirmada pelas correlações entre os teores de Ni disponíveis no solo e as concentrações do elemento nas diferentes partes das plantas (Tabela 2). Verifica-se que as correlações obtidas entre amostras de solo de solos de rizosfera e os tecidos vegetais foram positivas para todos os extratores utilizados (inclusive a digestão total do solo - USEPA), indiferente da cultura, soja ou girasol, ou parte da planta avaliada, e com nível de significância de 1% e coeficiente de correlação em torno de 80 e 90%. Rodak et al. (2015) obtiveram resultados positivos apenas nas correlações entre teores disponíveis (DTPA e Mehlich-1) no solo e concentração de Ni nos grãos. Valores de correções semelhantes aos verificados neste trabalho foram apresentados por Almeida et al. (2013), que avaliaram o desempenho agrônômico da alface (*Lactuca sativa*) sob fontes de N e doses de Ni utilizando-se dos extratores DTPA e mehlich-3 e, embora os autores não realizaram coletas de solo seguindo o método de Silva et al. (2002), as raízes fasciculadas da alface apresentam uma distribuição mais uniforme de modo que, a coleta de solo ocorre sempre próximo as raízes.

Muitos trabalhos têm sido realizados no intuito de desenvolver e, ou, avaliar um extrator eficiente em simular a disponibilidade dos metais pesados às plantas (LINDSAY; NORWELL 1978; MEHLICH, 1984; BECKETT, 1989; RAIJ, 1994; ABREU et al., 1995), neste sentido, tem se variado o tipo de: solo (ROVERS et al., 1983; RODAK et al., 2015), fontes de adubos (ANJOS; MATTIAZZO, 2001; MANTOVANI, et al., 2004; MACEDO et al., 2012) e as culturas (ZEITOUNI, et AL., 2007; COSCIONE; BERTON, 2009). Contudo, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, para o Ni a forma de amostragem tem sido mais importante que o extrator utilizado, de modo que a coleta de solo deve ser feita

muito próximo às raízes. Nesta condição, até mesmo os teores totais de Ni no solo apresentaram boas correlações com a concentração do elemento nas plantas. Contudo, faz-se necessário ainda, estabelecer curvas de calibração para os solos agrícolas bem como determinar níveis críticos de Ni para solos e plantas.

Tabela 2. Recuperação de níquel (Ni) pelos extratores Mehlich-1, Mehlich-3 e DTPA, em solo sob duas saturações por bases e cinco doses de Ni cultivado com soja seguido de girassol

		0,0 mg dm <sup>-3</sup>	0,1 mg dm <sup>-3</sup>	0,5 mg dm <sup>-3</sup> mg kg <sup>-1</sup>	1,0 mg dm <sup>-3</sup>	10,0 mg dm <sup>-3</sup>					
		Soja									
Mehlich 1	V50% <sup>a</sup>	0,0615	± 0,0070 <sup>AB</sup>	0,1273	± 0,0307 <sup>AB</sup>	0,2167	± 0,0105 <sup>AB</sup>	0,3951	± 0,0948 <sup>AB</sup>	4,6058	± 0,3548 <sup>AA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,0799	± 0,0195 <sup>AB</sup>	0,0956	± 0,0230 <sup>AB</sup>	0,2375	± 0,0401 <sup>AB</sup>	0,3301	± 0,0631 <sup>AB</sup>	2,4434	± 0,8334 <sup>BA</sup>
Mehlich 3	V50% <sup>a</sup>	0,1084	± 0,0459 <sup>B</sup>	0,1115	± 0,0135 <sup>B</sup>	0,2513	± 0,0134 <sup>B</sup>	0,4127	± 0,0110 <sup>B</sup>	2,8755	± 0,3763 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	0,1511	± 0,0027 <sup>B</sup>	0,1817	± 0,0120 <sup>B</sup>	0,2640	± 0,0339 <sup>B</sup>	0,4275	± 0,0370 <sup>B</sup>	2,6067	± 0,3022 <sup>A</sup>
DTPA	V50% <sup>a</sup>	0,0652	± 0,0043 <sup>AB</sup>	0,1100	± 0,0122 <sup>AB</sup>	0,3096	± 0,0466 <sup>AB</sup>	0,6032	± 0,1115 <sup>AB</sup>	6,2593	± 0,7048 <sup>AA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,0908	± 0,0072 <sup>AB</sup>	0,0969	± 0,0117 <sup>AB</sup>	0,2963	± 0,0496 <sup>AB</sup>	0,3906	± 0,0291 <sup>AB</sup>	2,9281	± 0,9276 <sup>BA</sup>
USEPA	V50% <sup>a</sup>	5,7882	± 0,8052 <sup>AB</sup>	5,7133	± 0,8306 <sup>AB</sup>	7,6199	± 1,1515 <sup>AB</sup>	7,9497	± 0,8051 <sup>AB</sup>	25,9334	± 3,6964 <sup>AA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	6,4418	± 0,8343 <sup>AB</sup>	6,6744	± 1,0284 <sup>AB</sup>	7,1727	± 0,7791 <sup>AB</sup>	7,1057	± 0,6015 <sup>AB</sup>	18,7855	± 4,5779 <sup>BA</sup>
		Girassol									
Mehlich 1	V50% <sup>a</sup>	0,0459	± 0,0236 <sup>AD</sup>	0,0847	± 0,0373 <sup>ACD</sup>	0,1661	± 0,0331 <sup>ABC</sup>	0,2233	± 0,0078 <sup>AB</sup>	1,6068	± 0,0928 <sup>AA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	0,0619	± 0,0231 <sup>AC</sup>	0,1168	± 0,0253 <sup>AC</sup>	0,1444	± 0,0075 <sup>AC</sup>	0,2513	± 0,0115 <sup>AB</sup>	1,4380	± 0,1139 <sup>BA</sup>
Mehlich 3	V50% <sup>a</sup>	0,0743	± 0,0279 <sup>AB</sup>	0,1671	± 0,0280 <sup>AB</sup>	0,5965	± 0,2319 <sup>AB</sup>	0,6909	± 0,2436 <sup>AB</sup>	8,6929	± 1,5005 <sup>AA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,2352	± 0,2836 <sup>AB</sup>	0,1728	± 0,0362 <sup>AB</sup>	0,3311	± 0,1351 <sup>AB</sup>	0,4286	± 0,1028 <sup>AB</sup>	3,9439	± 2,4129 <sup>BA</sup>
DTPA	V50% <sup>a</sup>	0,0682	± 0,0273 <sup>B</sup>	0,0903	± 0,0129 <sup>B</sup>	0,1698	± 0,0225 <sup>B</sup>	0,2705	± 0,0376 <sup>B</sup>	1,8011	± 0,4373 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	0,0739	± 0,0019 <sup>C</sup>	0,0897	± 0,0025 <sup>C</sup>	0,1733	± 0,0024 <sup>CB</sup>	0,2788	± 0,0266 <sup>B</sup>	1,903	± 0,1349 <sup>A</sup>
USEPA	V50% <sup>a</sup>	4,2412	± 0,2363 <sup>AB</sup>	4,1211	± 0,4194 <sup>AB</sup>	4,0608	± 0,1957 <sup>AB</sup>	4,3525	± 0,4056 <sup>AB</sup>	28,8629	± 1,7743 <sup>AA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	5,0570	± 2,3606 <sup>AB</sup>	4,3505	± 1,7352 <sup>AB</sup>	6,4809	± 0,3500 <sup>AB</sup>	6,3738	± 0,6180 <sup>AB</sup>	12,8521	± 0,6512 <sup>BA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. Soja: M1 (\*\*)(\*\*)(\*\*); M3<sup>(ns)</sup>(\*\*)(<sup>ns</sup>); DTPA (\*\*)(\*\*)(\*\*); Girassol: M1 (<sup>ns</sup>)(\*\*)(\*\*); M3 (\*\*)(\*\*)(\*\*); DTPA (<sup>ns</sup>)(\*\*)(<sup>ns</sup>) \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

Tabela 2. Correlação – disponibilidade de Ni no solo de rizosfera x concentração em plantas de soja e girassol

	Folha diagnose		Raíz		Parte Aérea		Grão	
	Soja	Girassol	Soja	Girassol	Soja	Girassol	Soja	Girassol
Mehlich 1	0,88**	0,96**	0,91**	0,94**	0,96**	0,90**	0,73**	0,88**
Mehlich 3	0,75**	0,92**	0,83**	0,92**	0,93**	0,93**	0,83**	0,69**
DTPA	0,91**	0,97**	0,90**	0,89**	0,93**	0,85**	0,71**	0,91**
USEPA	0,83**	0,88**	0,85**	0,94**	0,94**	0,95**	0,74**	0,62**

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

No comparativo dos extratores o DTPA apresentou maior coeficiente de correlação (entre Ni disponível no solo e concentração em folhas diagnósticas) para as duas culturas avaliadas. Este é também o extrator padrão utilizado para análise de micronutrientes em solos pelos laboratórios do Estado de São Paulo, contudo, as amostras de rotina e mesmo as de micronutrientes, não contemplam a análise do Ni.

Com base no extrator DTPA podemos inferir que a variação da disponibilidade de Ni no solo em função da saturação por bases e por consequência do pH, ocorreu de forma temporária e em função da concentração do Ni total do solo, de modo que, doses menores Ni (0 a 1 mg dm<sup>-3</sup>) não apresentaram diferenças quanto as saturação por bases, já doses mais elevadas (10 mg dm<sup>-3</sup>) apresentam grandes oscilações iniciais em função da saturação por bases (com referência aos resultados obtidos na avaliação da soja) que são reduzidas ao longo do tempo, conforme se observa nos resultados apresentados na cultura do girassol sob mesmas condições.

#### *Extração sequencial*

Devido a variação dos teores disponíveis apresentada pelos extratores Mehlich-1, Mehlich-3 e DTPA em função: do tempo (análises no período de cultivo da soja e do girassol); saturações por bases e; doses de Ni, não foi estabelecer correlações entre as extrações simples e o fracionamento de Ni no solo. Contudo, destaca-se que as extrações simples realizadas no estágio R1 de cada cultura foi realizada a partir de amostras de solo de rizosfera, enquanto as extrações sequenciais foram realizadas ao final do cultivo das duas culturas, a partir de amostras representativas de casa vaso. Ressalta-se ainda que as amostras de solo de rizosfera apresentaram teores totais de Ni (USEPA) muito maiores que a análises de extração sequencial do elemento, indicando novamente que tipo de amostragem de solo

pode ser mais significativo para o elemento que o método utilizado para prever sua disponibilidade.

Verificou-se Ni associado a todas as frações analisadas e a maior concentração de Ni foi determinada nos solos que receberam  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de solo indicando que a aplicação do elemento, mesmo que em pequenas doses contribuiu para o aumento de Ni no solo. Para efeito de proporcionalidade do Ni nas diferentes frações do solo, considerou-se a concentração de cada fração em relação ou Ni determinado pela fração total (Tabela 3).

A fração trocável de Ni no solo variou na ordem de  $0,0434 \text{ mg dm}^{-3}$  (determinado na dose de Ni de  $0 \text{ mg dm}^{-3}$  aplicado sob saturação por bases de 70%) até  $1,5917 \text{ mg dm}^{-3}$  (determinado na dose de  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni aplicado sob saturação por bases de 50%) de modo que a aplicação de  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni aumentou em mais 36 vezes a fração trocável de Ni no solo, mas ainda assim, apresentou valores muito menores que os recuperados pelas extrações simples.

A fração trocável foi influenciada pelos dois fatores avaliados no experimento e pela interação destes, sendo que nas maiores doses de Ni aplicada foram verificadas maiores concentrações de Ni trocável no solo indiferente da saturação por bases. Embora os demais tratamentos não tenham apresentado diferenças entre si, no comparativo da proporcionalidade verifica-se que quanto menor a dose de Ni aplicada maior a desproporção entre as saturações por bases avaliadas, de modo que o tratamento controle sob saturação por bases de 50% apresentou na fração trocável 3,30% do total do Ni no solo, enquanto na saturação por bases de 70% apenas 1,45% do Ni total foi determinado nesta fração. A variação nas frações disponíveis de Ni no solo em função de pequenas alterações de pH também foram relatadas por Ayodele; Mohammed (2011) em avaliações dos teores de Ni em solos da Nigéria por meio de extrações simples e fracionamento.

Tabela 3. Extração sequencial de níquel (Ni) em solo sob duas saturações por bases e cinco doses de Ni cultivado com soja seguido de girassol

		0,0 mg dm <sup>-3</sup>		0,1 mg dm <sup>-3</sup>		0,5 mg dm <sup>-3</sup>		1,0 mg dm <sup>-3</sup>		10,0 mg dm <sup>-3</sup>	
		mg kg <sup>-1</sup>									
ES 1	V50% <sup>a</sup>	0,1022	± 0,01367 <sup>aB</sup>	0,1256	± 0,01657 <sup>aB</sup>	0,1247	± 0,02983 <sup>aB</sup>	0,3078	± 0,0167 <sup>aB</sup>	1,5917	± 0,1934 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,0434	± 0,0023 <sup>aB</sup>	0,0558	± 0,0075 <sup>aB</sup>	0,0954	± 0,0223 <sup>aB</sup>	0,2678	± 0,0002 <sup>aB</sup>	1,1833	± 0,2350 <sup>aA</sup>
ES 2	V50% <sup>b</sup>	0,0000	± 0,0000 <sup>aB</sup>	0,0000	± 0,0000 <sup>bB</sup>	0,0004	± 0,0003 <sup>bB</sup>	0,0022	± 0,0003 <sup>bB</sup>	0,0172	± 0,0024 <sup>bA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	0,0000	± 0,0000 <sup>aC</sup>	0,0076	± 0,0009 <sup>aB</sup>	0,0082	± 0,0012 <sup>aB</sup>	0,0101	± 0,0019 <sup>aB</sup>	0,0255	± 0,0029 <sup>aA</sup>
ES 3	V50% <sup>a</sup>	0,3537	± 0,0071 <sup>aC</sup>	0,9138	± 0,0384 <sup>aB</sup>	0,6816	± 0,0335 <sup>aBC</sup>	0,3398	± 0,1118 <sup>aC</sup>	1,5456	± 0,1787 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,0225	± 0,0007 <sup>bB</sup>	0,0620	± 0,0299 <sup>bB</sup>	0,1292	± 0,0142 <sup>bB</sup>	0,1534	± 0,0345 <sup>aB</sup>	1,2224	± 0,3937 <sup>aA</sup>
ES 4	V50% <sup>a</sup>	0,2005	± 0,0203 <sup>aC</sup>	0,2727	± 0,0294 <sup>aBC</sup>	0,3776	± 0,0338 <sup>aB</sup>	0,3691	± 0,0302 <sup>aB</sup>	1,4909	± 0,0058 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,2629	± 0,0453 <sup>aB</sup>	0,3036	± 0,0178 <sup>aB</sup>	0,3023	± 0,0787 <sup>aB</sup>	0,2862	± 0,0707 <sup>bB</sup>	0,8213	± 0,0582 <sup>bA</sup>
ESR	V50% <sup>a</sup>	2,9227	± 0,0487 <sup>B</sup>	2,9979	± 0,1253 <sup>B</sup>	3,2069	± 0,0601 <sup>B</sup>	3,4782	± 0,1712 <sup>B</sup>	7,2249	± 0,3973 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	3,0178	± 0,0487 <sup>B</sup>	2,9846	± 0,1059 <sup>B</sup>	3,2076	± 0,0729 <sup>B</sup>	3,5085	± 0,1070 <sup>B</sup>	7,1508	± 0,3620 <sup>A</sup>
EST	V50% <sup>a</sup>	3,0948	± 0,0980 <sup>aD</sup>	3,2105	± 0,0361 <sup>aCD</sup>	3,7522	± 0,2226 <sup>aBC</sup>	4,1760	± 0,1746 <sup>aB</sup>	12,0675	± 0,0715 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	2,9890	± 0,0477 <sup>aC</sup>	3,0024	± 0,1855 <sup>aC</sup>	3,3869	± 0,0836 <sup>aBC</sup>	3,7325	± 0,1238 <sup>bB</sup>	10,3322	± 0,6625 <sup>bA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator ES: extração sequencial. ES 1: solúvel e trocável (\*\*)(\*\*)(\*). ES 2: ligado a carbonato (\*\*)(\*\*)(\*\*). ES 3: ligado a matéria orgânica (\*\*)(\*\*)(\*\*). ES 4: ligado a óxidos de ferro cristalino (\*\*)(\*\*)(\*\*). ES R: residual (não ligado as frações anteriores) (<sup>ns</sup>)(\*\*)(<sup>ns</sup>). ES T: total (\*\*)(\*\*)(\*\*). <sup>ns</sup> = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

O Ni ligado a carbonato foi a fração que apresentou menor concentração de Ni e a única em que o elemento esteve em maior quantidade na saturação por bases de 70% comparado à saturação de 50%. Nos tratamentos que receberam as menores doses de Ni a fração do elemento ligada ao carbonato ficou abaixo do limite de detecção. Alguns autores sustentam a hipótese da necessidade de realizar essa etapa da extração apenas para solos com valores pH acima de 6, porém, como a metodologia do trabalho utilizou-se de doses variáveis de carbonatos para alcançar as saturações por bases desejadas, optou-se por não omitir essa fração, contudo, a maior adição de carbonatos (de Ca e Mg) nos solos sob saturação de 70% e por consequência elevação do pH por si só justifica os resultados encontrados.

Semelhante ao ocorrido na fração trocável, o Ni ligado à matéria orgânica apresentou grandes discrepâncias entre as saturações por bases avaliadas com maior concentração do elemento para saturação por bases de 50%. À exceção da fração residual, a fração de Ni ligada à matéria orgânica foi aquela que apresentou maior concentração de Ni em relação ao total do elemento no solo. Também semelhante à fração trocável, as menores doses de Ni apresentaram as maiores desproporções entre as saturações por bases numa mesma dose de Ni aplicada, de modo que sob saturação por bases de 50% as doses de 0 e 0,1 mg dm<sup>-3</sup> de Ni apresentaram respectivamente 11,43 e 28,46% do total do Ni contido no solo, ao passo que, nas mesmas doses sob saturação por bases de 70% apenas 0,75 e 2,07% do total do Ni no solo estavam ligados à matéria orgânica.

Tabela 4. Correlação –Ni nas diferentes frações do solo *x* concentração em plantas de soja e girassol

	Folha diagnose		Raíz		Parte Aérea		Grão	
	Soja	Girassol	Soja	Girassol	Soja	Girassol	Soja	Girassol
ES 1	0,83**	0,98**	0,88**	0,96**	0,96**	0,93**	0,81**	0,85**
ES 2	0,43**	0,79**	0,65**	0,75**	0,77**	0,73**	0,88**	0,89**
ES 3	0,72**	0,83**	0,78**	0,83**	0,80**	0,79**	0,57**	0,68**
ES 4	0,92**	0,93**	0,93**	0,96**	0,95**	0,95**	0,70**	0,70**
R	0,73**	0,97**	0,83**	0,93**	0,93**	0,88**	0,85**	0,91**

ES: extração sequencial. ES 1: solúvel e trocável (\*\*)(\*\*)(\*). ES 2: ligado a carbonato (\*\*)(\*\*)(\*\*). ES 3: ligado a matéria orgânica (\*\*)(\*\*)(\*\*). ES 4: ligado a óxidos de ferro cristalino (\*\*)(\*\*)(\*\*). ES R: residual (não ligado as frações anteriores) <sup>(ns)</sup>(\*\*)(<sup>ns</sup>). ES T: total (\*\*)(\*\*)(\*\*). \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

O Ni ligado a óxidos foi a fração distribuída mais uniformemente entre as doses aplicadas no comparativo com a concentração de Ni total do solo. Nos solos com saturação

por bases de 50%, cerca de 6,5% do Ni estava ligado a óxidos no tratamento controle e 12,35% na maior dose de Ni aplicada. Nos solos sob saturação por bases de 70% a variação foi menor, concentrando-se entre 7,7 a 10,11%. Contrária à fração trocável observou-se que nas menores doses de Ni aplicadas nos solos com saturação por bases de 70% havia maiores concentrações de Ni ligado a óxidos.

A fração residual concentrou a maior proporção de Ni entre as frações analisadas. Somente as doses de Ni influenciaram na concentração do elemento ligado a fração residual, dessa forma, foi aplicado o desdobramento das doses para cada saturação por bases. A maior concentração de Ni foi determinada na também na maior dose de Ni aplicada ( $10 \text{ mg dm}^{-3}$ ), nas duas saturações por bases avaliadas. Todavia, esse valores representam apenas 60 (na saturação por bases de 50%) e 69% (na saturação por bases de 70%) do Ni total do solo ao passo que os demais tratamentos, embora não tenham diferido entre si, representaram mais de 83% do total do Ni contido no solo.

As correlações entre a concentração de Ni nas diferentes partes das plantas e o Ni nas frações do solo de modo geral apresentaram altos coeficientes (Tabela 4). A excessão da parte aérea, as frações das plantas de girassol (raiz, folha diagnose e grãos) apresentaram maiores correlações com o Ni nas frações do solo, no comparativo entre as duas culturas. Esse resultado pode ser justificado pelo período de coleta do solo, uma vez que ocorreu imediatamente após a colheita do girassol. Ni solúvel e trocável e ligado a oxido de ferro cristalino foram as frações que apresentaram maiores coeficientes de correlação com as concentrações de Ni nas plantas analisadas. A literatura apresenta para metais pesados, baixas correlações entre os teores no solo e nos grãos das culturas (NOGUEIRA et al., 2010), todavia, esses metais como cádmio, chumbo entre outros, não possuem essencialidade reconhecida as plantas e são redistribuídos para os grãos em baixas quantidades ou nulas. Efeito oposto ocorre com o Ni que tende a concentrar-se nas estruturas reprodutivas a partir do período de florescimento (MALAVOLTA et al., 2006).

#### *Atividade enzimática do solo*

As saturações por bases afetaram de modo diferenciado a atividade da urease sob as duas culturas avaliadas (Tabela 5 e 6). Sob cultivo de soja a saturação por bases de 70% proporcionou maior atividade da enzima urease no solo, enquanto para a cultura do girassol ocorreu o oposto. O aumento da saturação por bases (V70%) na cultura da soja proporcionou atividade da urease no solo duas vezes maior que a saturação por bases de 50% nas quatro

primeiras doses de Ni avaliadas (0,0 a 1,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni), ao passo que na maior dose de Ni aplicada, a atividade desta enzima apresentou uma proporção de 3,5:1 no comparativo entre as saturações por bases (V50%:V70%).

Tabela 5. Atividade das enzimas urease (U) e desidrogenase (D) em solo de rizosfera cultivado com soja

		0,0 mg dm <sup>-3</sup>	0,1 mg dm <sup>-3</sup>	0,5 mg dm <sup>-3</sup>	1,0 mg dm <sup>-3</sup>	10,0 mg dm <sup>-3</sup>
		(mg kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )				
U	V50% <sup>b</sup>	23,59 ± 4,98 <sup>bA</sup>	22,96 ± 6,53 <sup>bA</sup>	25,69 ± 16,32 <sup>bA</sup>	19,95 ± 9,84 <sup>bA</sup>	29,40 ± 20,22 <sup>bA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	46,13 ± 5,78 <sup>aB</sup>	53,62 ± 6,54 <sup>aB</sup>	58,17 ± 6,35 <sup>aB</sup>	53,48 ± 7,93 <sup>aB</sup>	105,28 ± 7,04 <sup>aA</sup>
		(µg TFF g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )				
D	V50% <sup>b</sup>	5,13 ± 1,34 <sup>bBA</sup>	5,59 ± 2,19 <sup>aAB</sup>	8,47 ± 1,08 <sup>aA</sup>	1,99 ± 0,37 <sup>bb</sup>	2,34 ± 0,41 <sup>bb</sup>
	V70% <sup>a</sup>	9,54 ± 2,04 <sup>aA</sup>	4,84 ± 3,36 <sup>aBC</sup>	8,23 ± 1,98 <sup>aAB</sup>	3,43 ± 0,37 <sup>aC</sup>	6,31 ± 2,23 <sup>aABC</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator U: urease (\*\*)(\*\*)(\*\*); D: desidrogenase (\*\*)(\*\*)(\*).

Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

A influência da cobertura vegetal sobre a atividade da urease nos solos tem sido relatada ao longo dos anos (PANCHOLY; RICE, 1972; ARUNACHALAM; MELKANIA, 1999; LONGO; MELO 2005), contudo, esses trabalhos tem realizados “coletas tradicionais” de amostras de solos (na superfície do solo, 0 -5 cm ou 0 – 20 cm) e, muitas vezes o solos é encubado para avaliação das enzimas em função do tempo. A atividade da urease em solos de rizosfera apresentou resultados contrastantes aos da literatura, nos quais tem se observado maior atividade da enzima em resposta a maior disponibilidade de Ni. No comparativo das análises sob cultivo de soja e girassol verificou-se que as relações simbióticas planta/bactéria podem influenciar positivamente na atividade desta enzima.

Tabela 6. Atividade das enimas urease (U) e desidrogenase (D) em solo de rizosfera cultivado com girassol

		0,0 mg dm <sup>-3</sup>	0,1 mg dm <sup>-3</sup>	0,5 mg dm <sup>-3</sup>	1,0 mg dm <sup>-3</sup>	10,0 mg dm <sup>-3</sup>
		(mg kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )				
U	V50% <sup>a</sup>	57,40 ± 5,73 <sup>aA</sup>	62,86 ± 8,89 <sup>aA</sup>	41,72 ± 3,97 <sup>aB</sup>	42,35 ± 3,04 <sup>aB</sup>	35,49 ± 3,15 <sup>aB</sup>
	V70% <sup>b</sup>	27,51 ± 5,95 <sup>bA</sup>	29,12 ± 2,31 <sup>bA</sup>	29,62 ± 1,72 <sup>bA</sup>	30,31 ± 1,78 <sup>bA</sup>	24,08 ± 3,76 <sup>bA</sup>
		(µg TFF g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )				
D	V50% <sup>b</sup>	8,51 ± 0,92 <sup>bC</sup>	11,97 ± 0,71 <sup>aB</sup>	8,99 ± 0,90 <sup>bC</sup>	7,32 ± 1,49 <sup>bC</sup>	17,06 ± 1,91 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	16,11 ± 1,06 <sup>aB</sup>	13,11 ± 0,31 <sup>aC</sup>	11,06 ± 1,76 <sup>aC</sup>	20,80 ± 0,80 <sup>aA</sup>	11,38 ± 2,08 <sup>bC</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator U(\*\*)(\*\*)(\*\*) D(\*\*)(\*\*)(\*\*). Minúscula: coluna.

Maiúscula: linha.

As saturações por bases afetaram a atividade da desidrogenase no solo semelhantemente nos dois cultivos de modo que a saturação por bases de 70% proporcionou maior atividade da enzima. Quanto as doses de Ni a atividade desta enzima foi afetada de modo diferenciado de acordo com a cultura. Enquanto as maiores doses de Ni afetaram negativamente a atividade desta enzima no solo sob cultivo da soja, o oposto foi verificado quando cultivou-se girassol. Esses estudos confirmam a variação da sensibilidade das enzimas em função do ambiente (KUCHARSKI et al., 2009) e ressaltam a necessidade da avaliação de vários atributos mensurar a qualidade ambiental do solo.

## Conclusões

Para amostras de solos de rizosfera a utilização dos extratores: Mehlich 1, Mehlich 3 e DTPA; ou ainda a solução digestora USEPA apresentaram altos coeficientes de correlação com os diferentes tecidos das culturas avaliadas em prever a disponibilidade de Ni às plantas, necessitando apenas de tabelas de calibração para o solo.

O Ni apresentou distribuição variável entre as diferentes frações do solo em função dos tratamentos. Os tratamentos que apresentaram solo com saturação por bases de 70% apresentaram maior concentração de Ni ligado a carbonato, comparado aos tratamentos sob saturação por bases de 50%. A distribuição do Ni entre as frações do solo seguiu a seguinte ordem: ligado a carbonato < trocável < ligado a óxidos < matéria orgânica < residual.

A saturação por bases exerceu efeito diferenciado sobre atividade da urease em função da cultura teste. O Ni exerceu efeito diferenciado sobre a atividade de desidrogenase em função da cultura teste.

## Referências

- ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; RAIJ, B.; SANTOS, W. R. Comparação de métodos de análise para avaliar a disponibilidade de metais pesados em solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 19, p. 463-468, 1995.
- ADRIANO, D. C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York, Springer, 1986. 147 p.
- ANDRADE, S. A. L.; ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; SILVEIRA, A. P. D. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and Rhizobium symbioses under soybean plants. **Applied Soil Ecology**, v. 26, p. 123-131, 2004.
- ANJOS, A. R. M.; MATTIAZZO, M. E. Extratores para Cd, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb e Zn em Latossolos tratados com biossólidos e cultivados com milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 337-344, 2001.
- BARMAN, M.; DATTA, S. P.; RATTAN, R. K.; MEENA, M. C. Chemical fractions and bioavailability of nickel in alluvial soils. **Plant, Soil and Environment**, Praha, v. 61, p. 17-22, 2015.
- BECKETT, P. H. The use of extractants in studies on traces metals in soil, sewage sludge, and sludge-treated soil. **Advances in Soil Science**, v. 9, p. 143-176, 1989.
- BREMNER, J. M.; KEENEY, D. R. Exchangeable ammonium, nitrate and nitrite by steam-distillation methods. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1965. p. 1191-1206.
- CASIDA Jr., L. E. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, p. 630-636, 1977.
- COSCIONE, A. R.; BERTON, R. S. Barium extraction potential by mustard, sunflower and castor bean. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 59-63, 2009.

DELFELOPO, B. V. E.; RIBEIRO, A. C. **Análise química do solo**. Viçosa: UFV, 1981. (Boletim Extensão, 29).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1992. 315 p.

KACZYŃSKA, G.; BOROWIK, A.; WYSZKOWSKA, J. Soil dehydrogenases as an indicator of contamination of the environment with petroleum products. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 226, p. 372, 2015.

KIEKENS, L.; COTTENIE, A. Principles of investigation on the mobility and plant uptake of heavy metals. In: LESCHBER, R.; DAVIES, R.D.; L'HERMITE, P. (Ed.). **Chemical methods for assessing bioavailability metals in sludge and soils**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 32-41.

KUCHARSKI, J.; BOROS, E.; WYSZKOWSKA, J. Biochemical activity of nickel-contaminated soil. **Polish Journal of Environmental Studies**, Krakow, v. 18, p. 1039-1044, 2009.

LINDSAY W.L.; NORWELL W.A. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper, **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 42, p. 421-428, 1978.

LONGO, R. M.; MELO, W. J. Hidrolise da uréia em Latossolos: efeito da concentração de uréia, temperatura, pH, armazenamento e tempo de incubação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 651-657, 2005.

LONGO, R. M.; MELO, W. J.; PAVAN, S. A.; CHELLI, R. A.; LEITE, S. A. A. Efeito da secagem ao ar, tempo e condições de armazenamento, concentração de uréia, temperatura, pH

e tempo de incubação na atividade da urease em dois solos do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., **Anais...** Porto Alegre, 1991.

MACEDO, F. G.; MELO, W. J.; MERLINO, L. C. S.; RIBEIRO, M. H.; MELO, G. M. P.; CAMACHO, M. A. Acúmulo e disponibilidade de cromo, cádmio e chumbo em solos tratados com lodo de esgoto por onze anos consecutivos. **Semina**, Londrina, v. 33, p. 101-114, 2012.

MALAVOLTA, E.; LEÃO, H. C.; OLIVEIRA, S.C.; LAVRES JUNIOR. J.; MORAES, M. F.; CABRAL, C. P.; MALAVOLTA, M. Repartição de nutrientes nas flores, folhas e ramos da laranjeira cultivar Natal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, p. 506-511, 2006.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1989. 319 p.

MANTOVANI, J. R.; CRUZ, M. C. P.; FERREIRA, M. E.; ALVES, W. L. Extratores para avaliação da disponibilidade de metais pesados em solos adubados com vermicomposto de lixo urbano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 371-378, 2004.

MATTIAZZO, M. E.; BERTON, R. S.; CRUZ, M. C. P. Disponibilidade e avaliação de metais pesados potencialmente tóxicos. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C. P.; RAIJ, B.; ABREU, C. A. (Eds.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. 222 p.

MAY, P. B.; DOUGLAS, L. A. Assay for soil urease activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 45, p. 301-305, 1976.

MEHLICH, A. Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 15, p. 1409-1416, 1984.

MILOSEVIC, N.; GOVEDARICA, M.; KASTORI, R.; PETROVIC, N. Effect of nickel on wheat plants, soil microorganisms and enzymes. **Studia Universitatis Babes-Bolyai, Biologia, Bolyai**, v. 47, p. 79-84, 2002.

NAKAGAKI, S.; FRIEDERMANN, G. R.; CAIUT, J. M. A. Metil coenzima M redutase (MCR) e o fator 430 (F430). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 1003-1008, 2006.

NOGUEIRA, T. A. R.; MELO, W. J.; FONSECA, I. M.; MARCUSSI, S. A.; MELO, G. M. P. Fractionation of Zn, Cd and Pb in a tropical soil after nine-year sewage sludge applications. **Pedosphere**, Palo Alto v. 20, p. 545-556, 2010.

OLIVEIRA, T. C.; FONTES, R. L. F.; REZENDE, S. T.; ALVAREZ V. V. H. Effects of nickel and nitrogen soil fertilization on lettuce growth and urease activity. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 698-706, 2013.

PIERRISNARD, F. **Impact de l'amendement dès boues résiduaires de la ville de Marseille sur de sols a vocation agricole**: comportement du Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn, des hydrocarbures et des composés polaires. 1996. 184 f. Thèse (Docteur) - Université de Droit d'Economie et dès Sciences, Marseille, 1996.

RAIJ, B. New diagnostic techniques, universal soil extractants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, p. 799-816, 1994.

RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. 285 p.

RAIJ, B. New diagnostic techniques, universal soil extractants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, p. 799-816, 1994.

RODAK, B. W.; MORAES, M. F.; PASCOALINO, J. A. L.; OLIVEIRA JUNIOR, A.; CASTRO, C.; PAULETTI, V. Methods to quantify nickel in soils and plant tissues. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, p. 788-793, 2015.

ROVERS, H.; CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S. Níquel total e solúvel em DTPA em solos do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 7, p. 217-220, 1983.

SAS Institute. **SAS/STAT**: user's guide, version 6.11. 4. ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1996. v. 2, p. 842.

SCHEIDEGGER, A. M.; FENDORF, M.; SPARKS, D. L. Mechanisms of nickel sorption on pyrophyllite: macroscopic and microscopic approaches. **Soil Science Society of America Journal**, Madson, v. 60, p. 1763-1772, 1996.

SILVA, F. A. M.; NOGUEIRA, F. D.; GUIMARÃES, P. T. G.; GIDINHO, A.; MALTA, M. R. Determinação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular na rizosfera de cafeeiro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Ciências e Agrotécnica**, Lavras, edição especial, p. 1391-1395, 2002.

SILVEIRA M. L.; ALLEONI L. R. F.; O'CONNOR G. A.; CHANG A. C. Heavy metal sequential extraction methods: a modification for tropical soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 64, p. 1929-1938, 2006.

SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado**: correção do solo e adubação. 2. ed. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 416 p.

TEIXEIRA, S. T.; MELO, W. J.; SILVA, E. T. Heavy metals in a degraded soil treated with sludge from water treatment plant. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 498-501, 2005.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G. C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 51, p. 844- 851, 1979.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Acid digestion of sediments, sludges and soils**: metod 3050b. Washington: EPA, 1996. 12 p.

UREN, N. C. Forms, reaction and availability of nickel in soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 48, p. 141-203, 1992.

Wyszkowska J.; Kucharski J. Correlation between the number of cultivable microorganisms and soil contamination with diesel oil. **Polish Journal of Environmental Studies**, Krakow, v. 14, p. 347–356, 2005.

ZEITOUNI, C. F.; BERTON, R. S.; ABREU, C. A.; Fitoextração de cádmio e zinco de um Latossolo vermelho-amarelo contaminado com metais pesados. **Bragantia**, Campinas, v. 66, p. 649-657, 2007.

### **CAPÍTULO III – DOSES DE NÍQUEL E SATURAÇÕES POR BASES NO DESEMPENHO AGRONÔMICO DA SUCESSÃO SOJA E GIRASSOL**

#### **Resumo**

Estudos envolvendo a disponibilidade de níquel (Ni) no sistema solo planta, em sua grande maioria, têm focado o elemento com poluente do solo sem, contudo, abordar suas funções no metabolismo vegetal. O desempenho agronômico das culturas em resposta a adição de Ni pode oferecer subsídios para elaboração de níveis críticos para as plantas. Objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito de doses de Ni e saturações por bases no estado nutricional, bem como avaliar as características agronômicas de plantas de soja e girassol. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação em esquema fatorial 2 x 5, com duas saturações por bases (50 e 70%), cinco doses de Ni (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 10 mg dm<sup>-3</sup>), com sete repetições. Foram cultivadas em vasos, plantas de soja seguidas por plantas de girassol. Aos 30 e 60 dia após a emergência de cada espécie foram avaliados: a altura de plantas (AP), o diâmetro do caule (DC), o número de nós (NN), o estágio fenológico (EF), o índice SPAD e o diâmetro do capítulo (DCap) (para girassol). No estágio R1 (início do florescimento) de cada cultura foram coletadas as plantas de quatro vasos por tratamento e separadas em: folhas utilizadas para diagnose, raízes, parte aérea e nódulos (para a soja) para a determinação das concentrações dos nutrientes. Os três vasos restantes foram colhidos no estágio R7 para determinação de produtividade de grãos. O índice SPAD em soja aos 60 d.a.e., a produção de massa seca da parte aérea da soja e da raiz de girassol foram influenciados pela saturação por bases, doses de níquel e pela interação destes. Foram influenciados pelas saturações por base e doses de níquel (fatores isolados): para soja: AP aos 60 d.a.e., NN aos 30 e 60 d.a.e., SPAD aos 30 d.a.e.; para girassol: AP e NN aos 30 e 60 d.a.e., DC e SPAD aos 30 d.a.e. As demais variáveis avaliadas aos 30 e 60 d.a.e. foram influenciadas apenas pela saturação por bases, ou doses de Ni separadamente. O balanço nutricional da soja e do girassol foi afetado pela saturação por bases, doses de Ni e pela interação dos nutrientes. Plantas que receberam 0,5 mg dm<sup>-3</sup> de Ni na saturação por bases de 70% apresentaram as melhores características agronômicas. A redistribuição do Ni das folhas para os grãos é mais afetada pela saturação por bases que doses de Ni. A produção de grãos de soja e girassol não foi influenciada pelos tratamentos.

## Introdução

Os principais estudos envolvendo o níquel Ni no sistema solo planta têm focado o elemento com poluente do solo avaliando principalmente seus impactos ambientais (MOLAS, 2002) bem como os efeitos deletérios às plantas (KÖRNER et al., 1987; BERTON et al., 2006; DRAZKIEWICZ; BASZYNSKI, 2010; MISHRA; DUBEY, 2011). Desta forma utilizam-se de doses muito além da necessidade das culturas como nos trabalhos realizados por Ahmad et al., (2011) até 40 mg L<sup>-1</sup>; Iori et al., (2013) até 150 µM, Charles; Isaac (2014) até 25 ppm; Bazihizina et al., (2015) até 1000µM. Por se tratar de elemento que contempla a condição de metal pesado e micronutriente, seus aspectos nutricionais sob a ótica da avaliação do estado nutricional devem ser levados em conta. A avaliação do uso de “doses nutricionais” de Ni quanto aos aspectos agronômicos dos cultivos não tem tido a mesma atenção dada à avaliação ambiental do elemento. Alguns nutrientes que outrora não eram limitantes a produção, com o melhor desempenho dos cultivos (altas produtividades requerem grandes exportações de nutrientes), concentração dos macronutrientes nos formulados e não reposição do elemento ao solo impulsionou áreas de produtores de grãos a apresentarem limitações de produtividade pelo déficit de micronutrientes. Alguns estudos com a cultura da soja em solos tropicais têm demonstrado que a elevação da saturação por bases por meio da calagem tem levado a deficiências de micronutrientes (Novais et al, 1989; Abreu et al. 1994; Caires et al, 2003), notadamente Zn e Mn. Contudo, estes estudos não têm investigado o Ni. Ressalta-se o trabalho desenvolvido por Neves et al., (2007), no qual verificaram resposta do umbuzeiro, uma espécie nativa do Brasil, à adição de níquel em solução nutritiva, reportando a necessidade de investigar fome oculta.

Atualmente a soja apresenta a maior cadeia produtiva do Brasil (HIRAKURI et al., 2014), com destaque para não utilização de fontes minerais de nitrogênio (N) na adubação da cultura, que utiliza-se da fixação biológica de nitrogênio como a principal fonte para o elemento. Neste caso, além do Ni exercer importante papel na assimilação do nitrogênio via ciclo da uréia, os bacterióides também utilizam-se de Ni no desdobramento do hidrogênio produto da nitrogenase pela enzima hidrogenase (URETA et al., 2005). A simbiose em algumas leguminosas é reportada por Polacco et al., (2013), os quais descrevem que para a máxima eficiência da hidrogenase o suprimento de Ni deverá estar próximo do nível tóxico às plantas. Os autores ainda destacam que muitas vezes a quantidade de Ni necessária é inferior a encontrada normalmente nos solos agrícolas.

Os primeiros relatos atribuindo acréscimos de produtividade ao Ni são datados de meados do século passado (ROACH; BARCLAY 1946), contudo outros efeitos benéficos

também foram atribuídos ao Ni na germinação de sementes (DALTON et al., 1988), fotossíntese em plantas de milho (DRAOGONEKZ; BASZYŃSKI, 2010) além dos efeitos deletérios no metabolismo do carbono (C) e do N provocados pela deficiência de Ni relatados para culturas anuais (POLACCO et al., 2013), de modo que o estado nutricional das culturas deve ser avaliado quanto a influência do elemento no balanço dos demais nutrientes.

Charles; Isaac (2014), estudando o efeito do Ni na cultura *Amaranthus spinosus*, verificaram que o elemento alterou sensivelmente a absorção de macro e micronutrientes, mesmo efeito observado por Paiva et al. (2003), em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), e por Ahmad et al. (2011) no girassol (*Helianthus annuus*). Porém, este efeito foi verificado quando as plantas foram expostas a elevadas doses do elemento sob as quais podem ocasionar também a manifestação de clorose, inibição da fotossíntese e respiração, redução na absorção de água, indução do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio, embora o Ni não seja um metal com caráter redox (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA 2006; CHEN et al., 2009) – ou seja, alteração da valência conforme, função estrutural ou reação específica.

Sabendo-se do limitado número de estudos quanto ao uso de “doses nutricionais” de Ni nas características agronômicas das culturas e quanto às desordens nutricionais dos elementos, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito de doses de Ni e de saturações por bases no balanço nutricional dos nutrientes bem como em alguns parâmetros agronômicos das culturas da soja e girassol.

## **Material e métodos**

O experimento foi desenvolvido em vasos com capacidade de 10 dm<sup>3</sup>, em casa de vegetação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no município de Piracicaba – SP, localizado a 22°43'12"S e 47°38'54"O, com 580 m de altitude. Para preenchimento dos vasos foram utilizadas amostras coletadas da camada de 0 – 20 cm de um Nitossolo (EMBRAPA, 2013) coletado na área experimental da Agencia Paulista de Tecnologia e Agronegócios (APTA), unidade de Piracicaba – SP.

Para alcançar os objetivos do experimento, foram utilizados 70 vasos distribuídos inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2 x 5, com sete repetições para cada tratamento. O primeiro fator foi constituído de duas saturações por base 50 e 70%, e o segundo constituiu de cinco doses de Ni (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de solo); os vasos foram cultivados com soja e sucedidos por girassol (duas plantas por vaso para cada cultura).

### *Cultivo da soja*

Os vasos foram preenchidos com um volume de 8,8 kg/vaso de terra equivalente a 8 dm<sup>3</sup> para uma densidade de 1,1 kg dm<sup>-3</sup>, conforme mensurações em laboratório. As características físico-químicas da amostra de TFSA foram: pH (CaCl<sub>2</sub>) 5± 0,15; matéria orgânica 40± 2,52 g dm<sup>-3</sup>; P (resina) 20± 2,00 mg dm<sup>-3</sup>; K 2,9± 0,26 mmolc dm<sup>-3</sup>; Ca 33± 0,00 mmolc dm<sup>-3</sup>; Mg 10± 0,58 mmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al 53± 5,51 mmolc dm<sup>-3</sup>; Al 1± 0,58 mmolc dm<sup>-3</sup> Ni (DTPA) 0,04± 0,00 mg dm<sup>-3</sup>. Simultaneamente ao preenchimento dos vasos, foi realizada a calagem individualmente, seguindo o método de saturação por bases e com dosagem necessária para atender os respectivos valores de saturação por bases. Foi utilizada a mistura física de carbonato de cálcio e magnésio p.a. na proporção 3:1, e realizou-se o balanço dos elementos com sulfato de cálcio e magnésio de modo que a única variável desse fator foi a fração carbonato. Após a incorporação dos corretivos os vasos foram irrigados diariamente até 50% da capacidade de campo e permaneceram nesta condição até a semeadura, a qual foi procedida após 30 dias da incubação do solo.

Foram utilizadas no experimento sementes comerciais de soja cultivar Codetec 202 (cuja concentração de Ni foi de 0,53 ± 0,02 mg kg<sup>-1</sup>) inoculadas com bactérias *B. japonicum* - estirpe Semia 5079 - conforme método preconizado por Hungria et al., (2001). A adubação de manutenção seguiu método preconizado por Malavolta et al. (1980), com omissão de N (garantido pela inoculação) de modo que foram aplicadas as seguintes concentrações em ppm: P 200; K 150; Ca 75; Mg 15; S 50; B 0,5; Cu 1,5; Fe 5; Mo 0,1; Zn 5. O Ni foi aplicado por meio de solução estoque 2,7 mmol L<sup>-1</sup> utilizando-se sulfato de níquel hidratado (NiSO<sub>4</sub> • 6H<sub>2</sub>O), de acordo com cada tratamento.

Aos 30 e 60 dias após a emergência (DAE) foram avaliadas as características agrônômicas: altura de plantas (AP), diâmetro do caule (DC), número de nós (NN) e, estágio fenológico (EF) e unidades SPAD (teor de clorofila). Para AP, foi utilizada fita métrica sendo medido da base do solo até a inserção da última folha no ápice da haste principal. O DC foi medido a 5 cm de altura do solo com auxílio de paquímetro. O NN foi obtido através de contagem simples e o EF, com base na escala de Fehr; Caviness (1977). Para avaliar as unidades SPAD utilizou-se de um clorofilômetro portátil.

Por ocasião do florescimento (estádio fenológico R1) foram coletadas: plantas inteiras de quatro vasos de cada tratamento. Nas plantas coletadas foram separados em folhas utilizadas para diagnose – 3º trifólio completamente aberto a partir do ápice da haste principal, seguindo método proposto por Malavolta et al. (1997); nódulos, raízes e parte aérea.

No estágio R7, foi realizada a colheita das plantas dos vasos restantes (três por tratamento) para determinar a produtividade (grãos) e demais análises laboratoriais.

#### *Cultivo do girassol*

Após a retirada das plantas de soja, o volume de terra dos vasos foi redimensionando para 7 dm<sup>3</sup> por vaso, preenchidos portanto com 7,7 kg de terra. Em seguida, foi semeado o girassol (híbrido HB29 cuja concentração de Ni nas sementes foi de  $4,17 \pm 2,3$  mg kg<sup>-1</sup>), seguindo os mesmos tratamentos. Além das sementes de girassol, foram acrescentados aos vasos somente a adubação de manutenção para cultura já descrita para soja acrescida de 300 ppm de N (1,98 g/vaso, aplicado 0,5 g por ocasião da semeadura na forma de nitrato de cálcio e o restante em duas coberturas - 1,0 + 0,48 g - na forma de ureia), conforme Malavolta et al. (1980).

Os procedimentos de coleta e avaliações das plantas de girassol aos 30, 60 DAE, no estágio R1 e por ocasião da colheita foram semelhantes aos efetuados na soja, adaptando as características da cultura. Neste sentido, foram avaliadas: AP, DC, NN, além do diâmetro do capítulo (DCap) e unidades SPAD.

#### *Análises laboratoriais*

Foram determinados em folhas utilizadas para diagnose de soja e girassol: os macronutrientes: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S); micronutrientes: boro (B); ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni) e molibidênio (Mo); Nos nódulos, raízes e parte aérea foram determinados os teores de N, Ca, Mg Cu, Zn, Mn e Ni.

O teor de N-kjeldahl foi determinado conforme o método descrito em Melo (1974), que consiste em oxidar o N-orgânico a N amoniacal pelo ácido sulfúrico em presença de catalisadores e elevadores de temperatura. O N amoniacal produzido foi quantificado por meio de titulação, com solução de ácido sulfúrico. As concentrações de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn e Ni foram determinados no extrato obtido por meio de digestão nitroperclórica. O P foi determinado pelo método colorimétrico (MALAVOLTA et al.,1997), o K por fotometria de chama (SARRUGE; HAAG, 1974) e o S por turbidimetria (VITTI, 1989). As concentrações dos demais elementos foram determinadas por espectrofotometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP-OES).

Nos grãos de soja e girassol oriundos da colheita, foram determinados: produtividade, massa de média de cada grão e os teores de Ni e N. A produtividade foi expressa em g/vaso,

com o teor de umidade corrigido para 13%. Para os teores de Ni e N, foram adotados os mesmos métodos empregados para a folha diagnose.

#### *Análise estatística*

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. Nos casos em que o teste F foi significativo a 1 ou 5% de probabilidade, foi aplicado teste de médias a 5% de probabilidade, utilizando o esquema fatorial. Quando não ocorreu interação entre os fatores foi realizado o teste de médias para doses de Ni em cada variável do primeiro fator (saturações por bases). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS - *System for Windows* 6.11 (SAS Inst., 1996).

### **Resultados e discussão**

#### *Características agronômicas*

##### *Soja*

Para AP aos 30 d.a.e., as plantas de soja foram influenciadas apenas pelas doses de Ni, no qual foi constatado diminuição a partir do tratamento controle até a maior dose aplicada. Já aos 60 d.a.e., ocorreu efeito inverso, de modo que, a maior dose de Ni proporcionou maiores valores para AP (Figura 1). Aos 60 d.a.e. as saturações por bases influenciaram na AP, porém sem a interação dos fatores, na qual a V70% proporcionou plantas maiores. Estes resultados podem ser justificados pela influência do Ni na relação planta/bactéria (simbiose), visto que nas primeiras semanas de desenvolvimento da soja a influência do nódulo quanto ao fornecimento de nitrogênio é pouco expressiva, ao passo que a literatura descreve a reserva cotiledonar como a principal fonte de nutrientes neste período (MARCOS FILHO et al., 1982; CÂMARA, 1992) nesse caso, aos 30 d.a.e. pode ocorrer excesso de Ni disponível às plantas. A partir do estabelecimento dos nódulos estas estruturas passam a exercer a função do fornecimento de N para a soja e, por consequência, as bactérias também demandam de Ni do meio, assim, observa-se efeito positivo do Ni quanto a este parâmetro, justificando o efeito inverso aos 60 d.a.e. Destaca-se que a exigência de Ni pelos nódulos, devido à relação simbiótica, é muito maior que a exigência da planta (POLACCO et al., 2013). Quanto ao maior desempenho das plantas sob saturação por bases de 70% para este parâmetro, segundo Leite; Araújo (2007) para valores de pH mais baixos ( $\leq 5$ ) há maior adaptação de fungos no solo e com valores de pH entre 6 a 8 ocorre maior desenvolvimento de bactérias e actinomicetos. Moreira; Siqueira (2006) apontaram que já a partir de pH acima de 5,5 a

nodulação e fixação biológica de nitrogênio (FBN) é favorecida, enquanto Lin et al. (2012) verificaram que baixos valores de pH podem afetar sensivelmente a nodulação da soja. Neste sentido, a saturação de 70% proporcionou melhor ambiente as bactérias do gênero *bradirizobium* no solo que proporcionou plantas maiores.

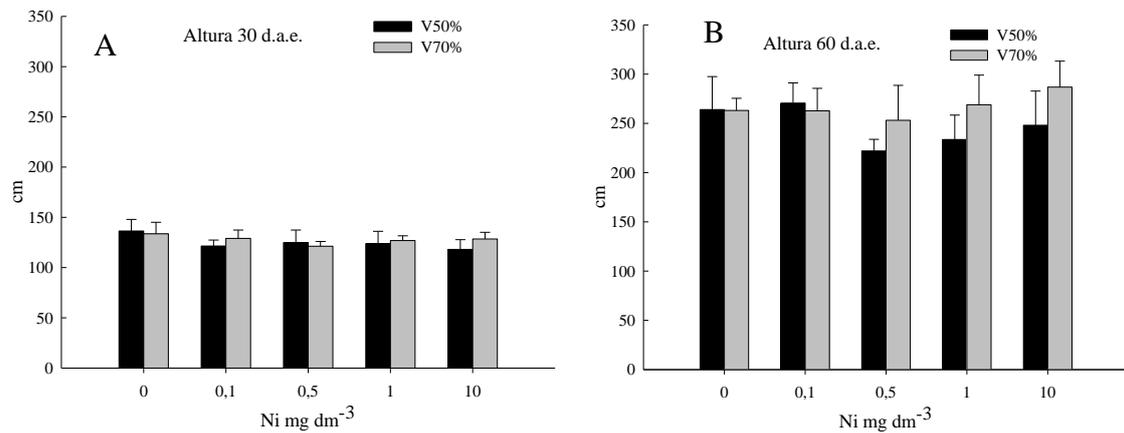


Figura 1. Altura de plantas de soja aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

O NN aos 30 e 60 d.a.e. foram igualmente influenciados pelo primeiro fator (saturação por bases), no qual a V70% proporcionou plantas com maior NN. As doses de Ni aos 30 d.a.e. resultaram em valores crescentes do número de nós a partir do tratamento controle até a última dose de Ni aplicada. Porém aos 60 d.a.e. somente as plantas submetidas às doses de 0,1 e 0,5 mg dm<sup>-3</sup> na V50% apresentaram diferenças (Figura 2). O número de nós tem importância quanto ao potencial de produção das plantas, pois a exceção dos dois primeiros nós (cotiledonar e primeiro par de folhas) todos os demais irão gerar ramos potencialmente reprodutivos. Quanto maior o número de ramos reprodutivos, maior o potencial de produtividade da planta.

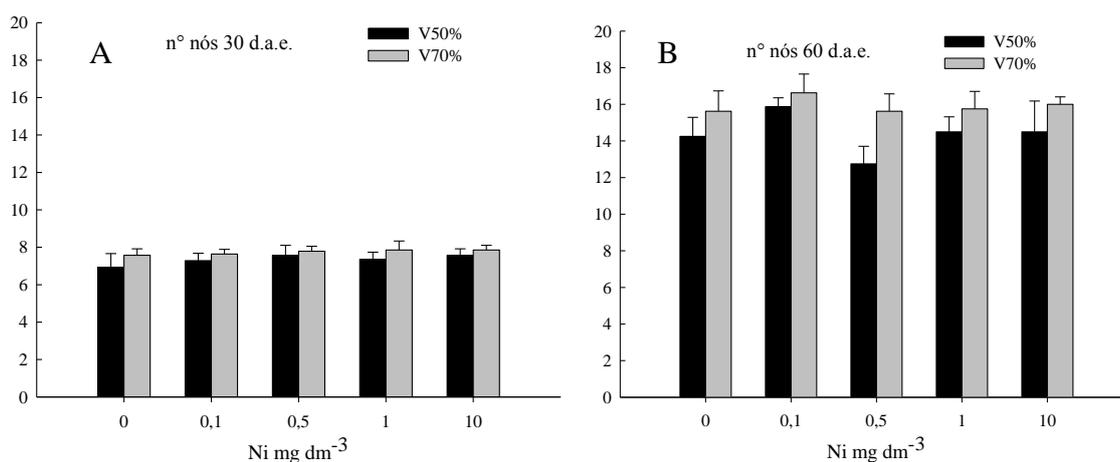


Figura 2. Número de nós em plantas de soja aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

O diâmetro do caule foi influenciado apenas aos 60 d.a.e. (utilizou-se de um paquímetro com precisão de 4 casas decimais, por isso a diferença pouco expressiva na figura) pelo fator saturação por bases com maiores valores para plantas cultivadas sob V70% (Figura 3), ao passo que para as unidades SPAD, as plantas cultivadas sob V50% foram 5% superior aos 30 d.a.e. (Figura 4). Verificou-se interação dos fatores aos 60 d.a.e. para as unidades SPADs das quais, plantas cultivadas sob V70% foram em média 8,5% superior àquela cultivadas sob V50% e, a partir do desdobramento desta interação observou-se que nas primeiras doses de Ni (tratamento controle e 0,1 mg dm<sup>-3</sup>) estes valores não foram influenciados pelas saturações por base. Quanto as doses de Ni, os maiores valores SPADs foram verificados nas plantas cultivadas sob V50% na dose de 0,1 mg dm<sup>-3</sup> de Ni enquanto na V70% a maior dose de Ni aplicada proporcionou plantas com maiores valores SPADs. Embora isoladamente a medida de unidade SPAD quantifique apenas tonalidade/intensidade da cor verde na planta, seu objetivo é estimar a concentração de clorofila na planta. Esta, por sua vez é largamente verificada na literatura, correlacionando-se com a concentração de N na planta (EVANS, 1989; RAAB; TERRY, 1994; FRITSCHI; RAY, 2007; LIU, 2012), o que nos permite juntamente com outros parâmetros avaliados estabelecer a relação Ni/N na planta.

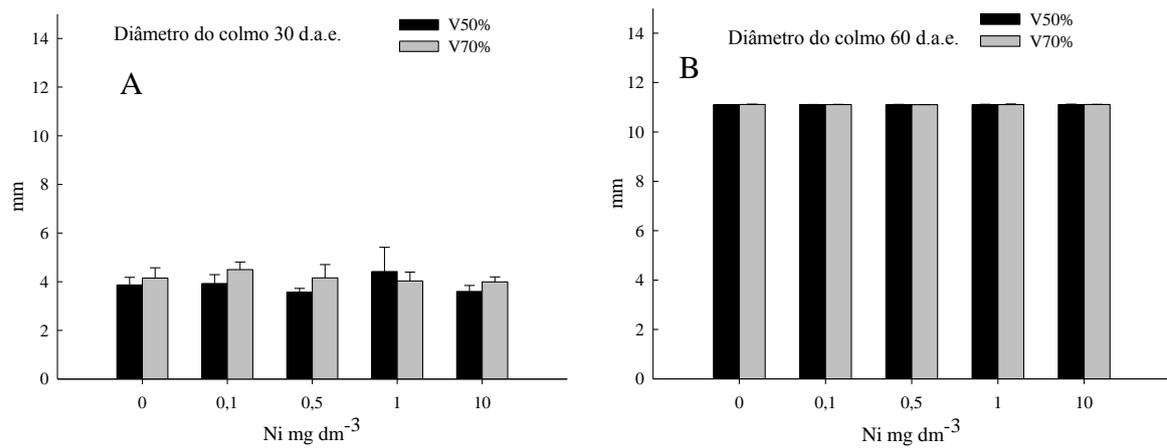


Figura 3. Diâmetro do caule em plantas de soja aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

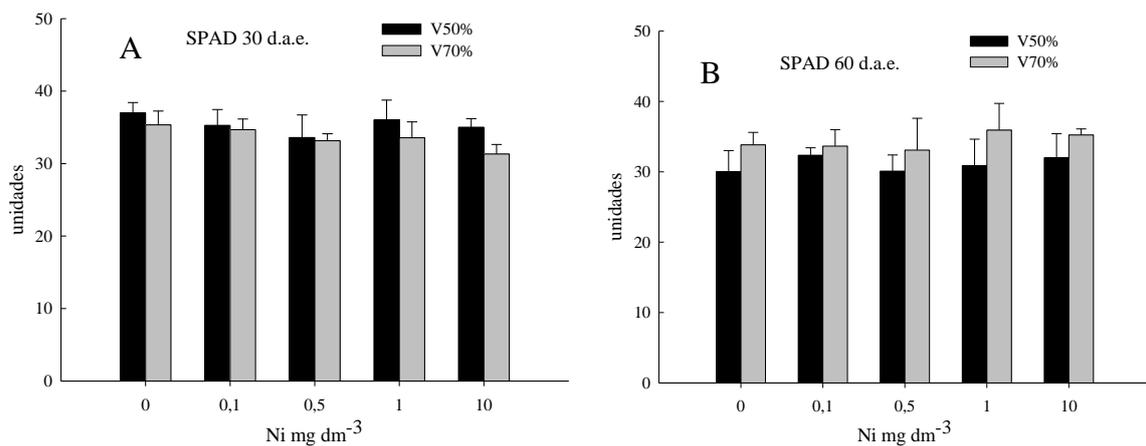


Figura 4. Unidades SPAD em plantas de soja aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

O número de nódulos foi influenciado pelas saturações por bases e doses de Ni (Figura 5) enquanto a massa de nódulos apresentou influência das doses de Ni e da interação dos fatores. As plantas cultivadas sob V70% apresentaram em média 21,5% mais nódulos que as cultivadas sob V50%, porém o maior número não interferiu na massa de nódulos. A estrutura física do vaso bem como o tipo de solo utilizado pode ter limitado a expansão dos nódulos e por consequência o aumento da massa. A dose de  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni apresentou plantas com o maior número e massa de nódulos em ambas saturações. Essa mesma dose também proporcionou maior massa seca de raiz (Figura 6). Já a massa seca da parte aérea foi 9,02% maior nas plantas cultivadas no solo com V70% e as doses de Ni influenciaram

negativamente esse parâmetro sendo que as plantas do tratamento controle apresentaram os maiores valores de massa.

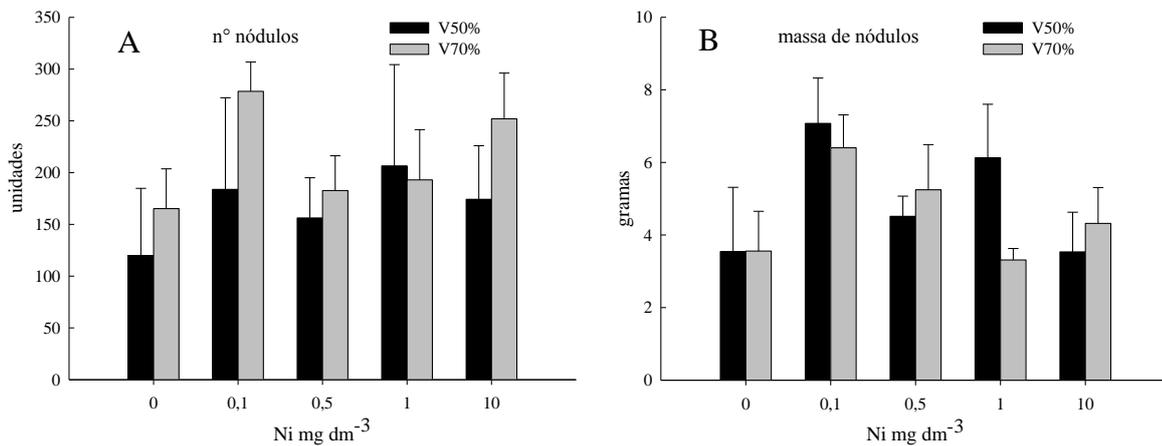


Figura 5. Número (A) e massa fresca de nódulos (B) em plantas de soja, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

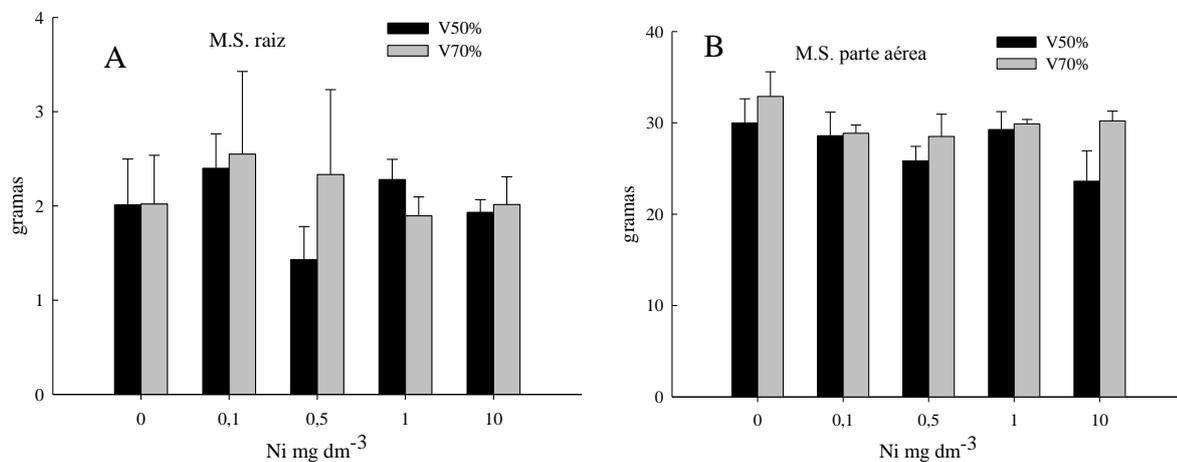


Figura 6. Massa seca de raiz (A) e da parte aérea (B) das plantas de soja, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo

Verifica-se na média geral que as plantas cultivadas sob V70% apresentaram maiores rendimentos para os parâmetros avaliados. Por fim, tanto a produtividade (Figura 7a), como o peso por sementes (Figura 7b) não foram influenciados pelos tratamentos.

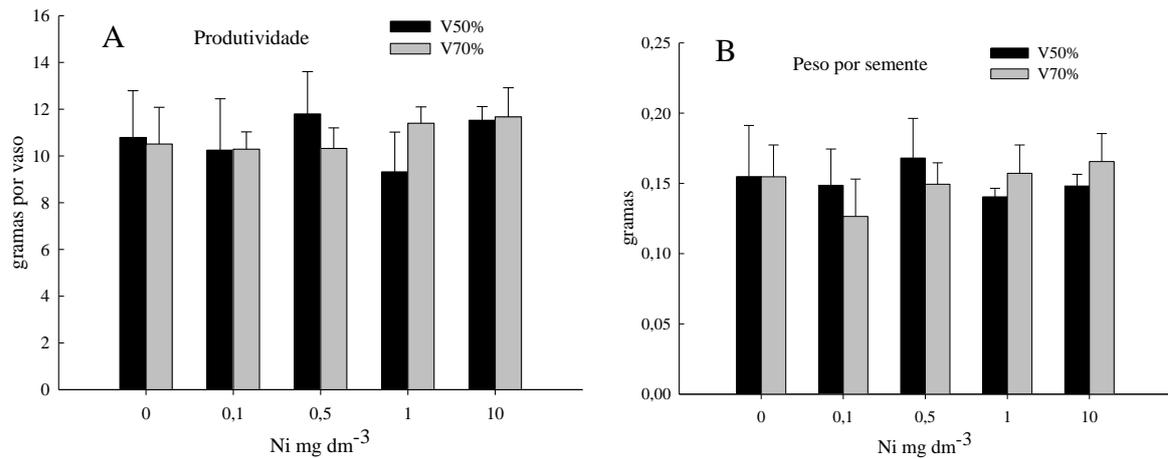


Figura 7. Produção de massa seca de grãos (A) e massa seca de semente (B) de plantas de soja, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

### *Girassol*

Os resultados referentes a AP (Figura 8) e NN (Figura 9) aos 30 e 60 d.a.e. apresentaram respostas semelhantes, nas quais verificaram-se influencia individual dos dois fatores (saturação por bases e doses de Ni) sob as plantas, porém não foram observadas interações. As plantas cultivadas sob V70% apresentaram sempre maiores valores para esses parâmetros enquanto para doses de Ni, aos 30 d.a.e., as plantas cultivadas sob dose de 10 mg dm<sup>-3</sup> apresentaram maiores valores para AP e NN. Aos 60 d.a.e. as doses de Ni não influenciaram a AP, porém as plantas apresentaram maior NN na dose de 0,5 mg dm<sup>-3</sup>. O NN verificado aos 30 d.a.e. foi inferior na comparação com os resultados apresentados por Aquino et al. (2013) para dez materiais comerciais de girassol (Embrapa 122 V-2000, Hélio 250, Hélio 251, Hélio 253, Hélio 358, Hélio 360, IAC Iarama, Dow Agrosience M 734 e MG 02) e, aos 60 d.a.e. verificou-se efeito contrário, no qual os materiais comerciais de girassol apresentaram NN inferiores aos verificados neste trabalho. No caso do girassol o maior NN representa, por consequência, maior número de folhas uma vez que o nó é caracterizado pelo ponto de inserção da folha no caule. A literatura também apresenta relação direta do número de folhas com a produtividade da cultura (ZOBIOLE et al., 2010), contudo, nem sempre esse efeito é verificado (AQUINO et al., 2013).

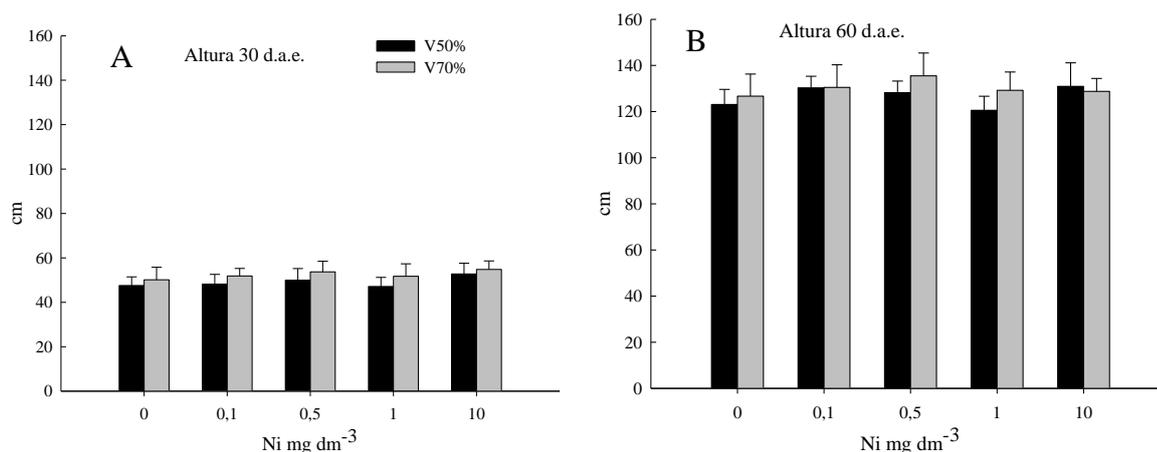


Figura 8. Altura de plantas de girassol aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

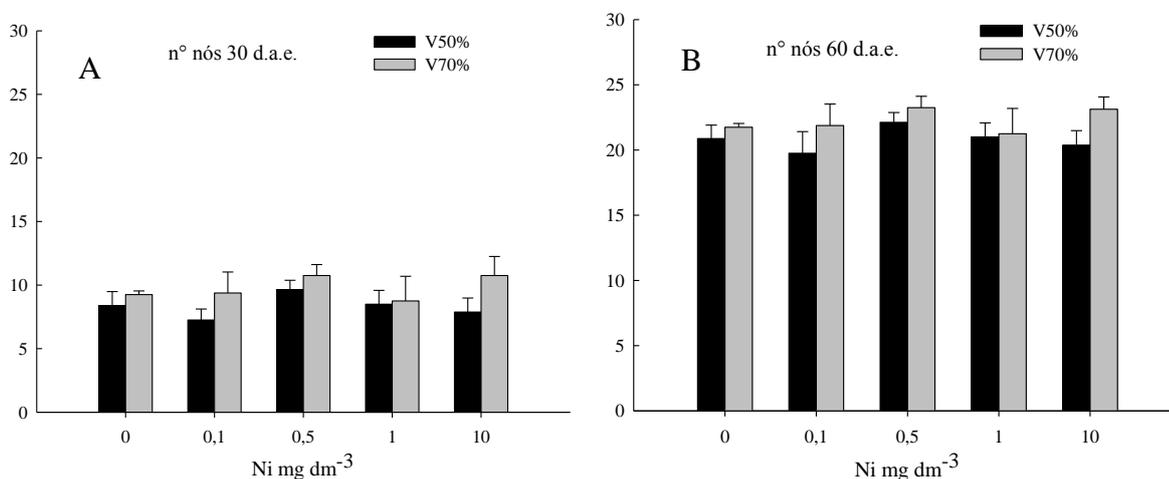


Figura 9. Número de nós em plantas de girassol aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

De acordo com os resultados obtidos nas avaliações de DC (Figura 10) e unidades SPAD (Figura 11), verificou-se que as plantas também foram semelhantemente influenciadas pelas saturações por bases, de modo que na V70% as plantas apresentaram maiores valores SPAD e DC aos 30 d.a.e. em comparação as plantas cultivadas sob V50%. Já aos 60 d.a.e., as saturações por base não influenciaram as plantas de girassol para esses parâmetros. Para o DC aos 30 d.a.e., foi verificado que as plantas de girassol apresentaram diferenças quando cultivadas sob as doses de Ni, de modo que constatou-se acréscimo de 14% no DC nas plantas cultivadas com a maior dose de Ni comparadas ao tratamento controle. Todavia, aos 60 d.a.e. as plantas de girassol apresentaram DC semelhantes sob todas as doses de Ni em que foram cultivadas. Para as unidades SPAD na avaliação realizadas aos 60 d.a.e., verificaram-se

apenas pequenas oscilações entre as doses de Ni aplicada, ao passo que as plantas cultivadas sob tratamento controle apresentaram maiores valores SPAD.

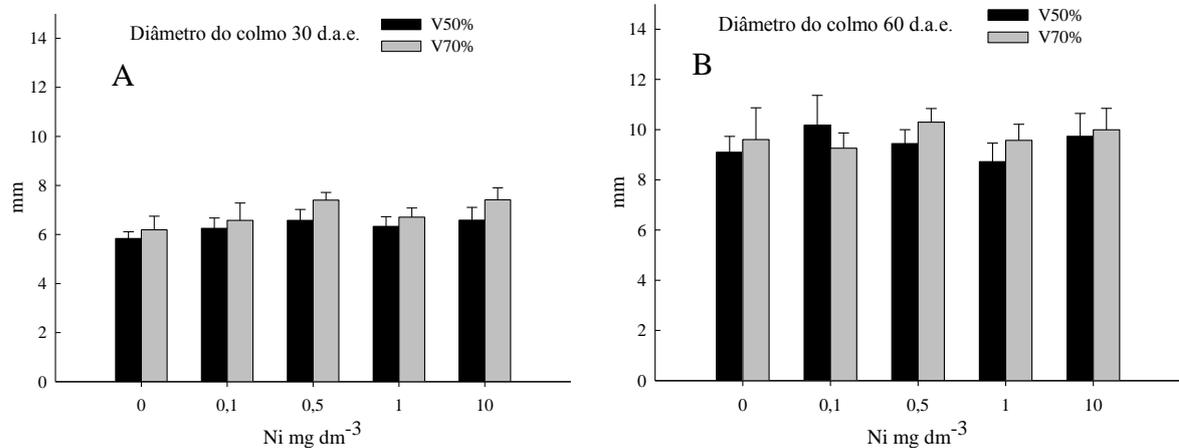


Figura 10. Diâmetro do colmo em plantas de girassol aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

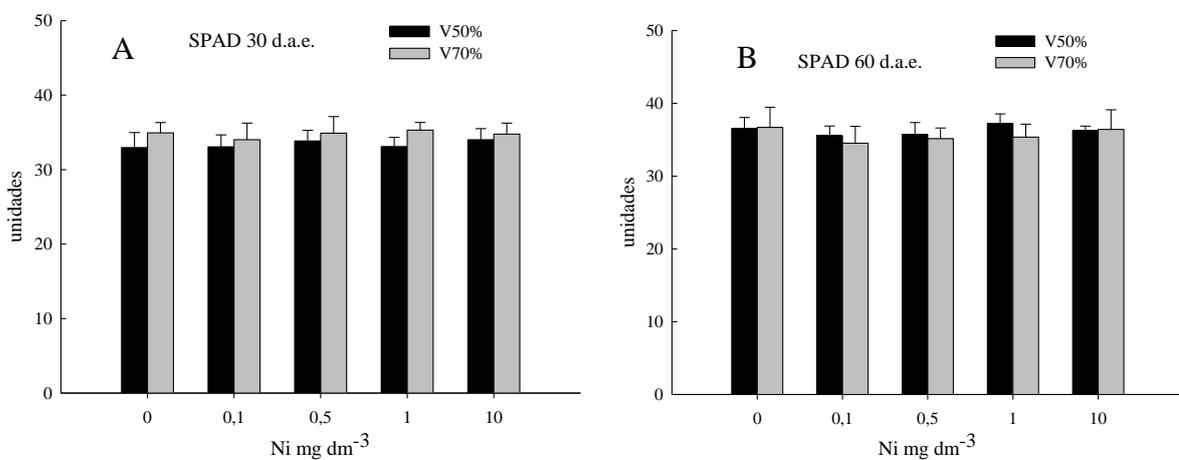


Figura 11. Teor de clorofila (em unidades SPAD) em plantas de girassol aos 30 (A) e 60 (B) dias após a emergência, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

Os valores referentes ao DCap e massa de capítulo (Figura 12) apresentaram oscilações dentro dos tratamentos, o que resultou em um alto coeficiente de variação e pouca resposta em função dos tratamentos. Raíz e parte aérea (Figura 13) apresentaram incrementos na ordem de 15 e 9 % respectivamente nas plantas cultivadas sob V70% em relação as cultivadas sob V50%. Quanto as doses de Ni, as diferenças foram mais evidentes nas plantas cultivadas sob V50% das quais a dose de 10 mg dm<sup>-3</sup> proporcionou valores da ordem de 43%

maiores em relação ao tratamento controle. Quanto a produtividade (Figura 14), esta também não foi influenciada por nenhum dos tratamentos.

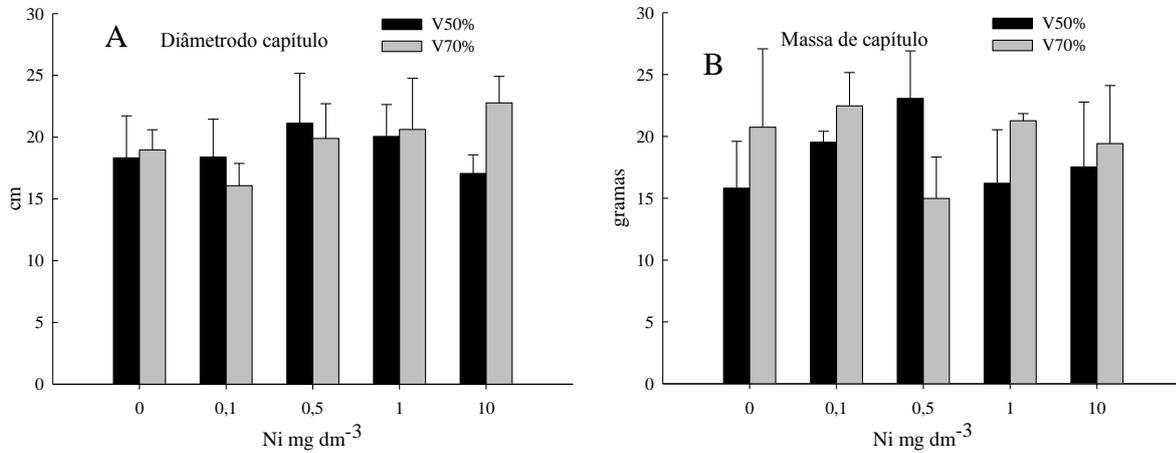


Figura 12. Diâmetro (A) e massa (B) de capítulo em plantas de girassol, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

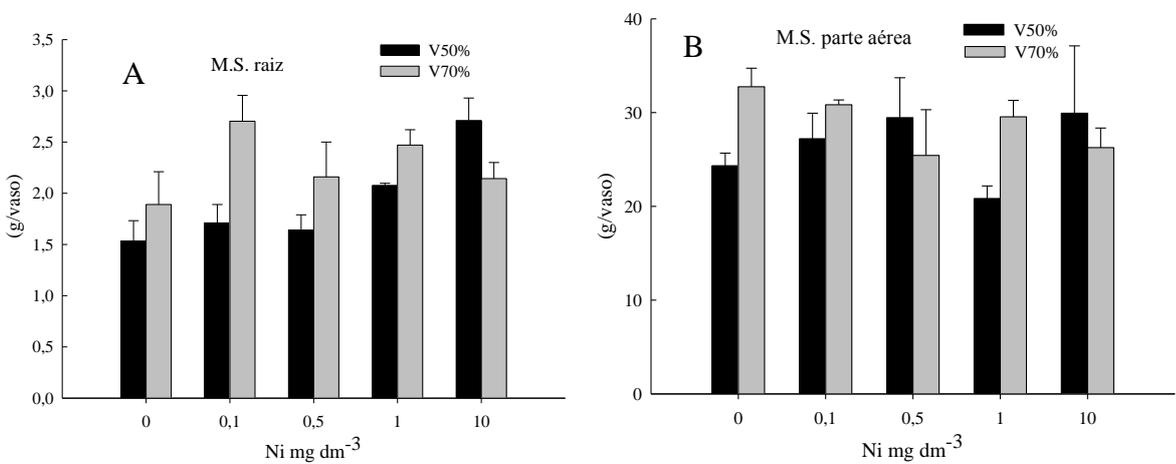


Figura 13. Massa seca de raízes (A) e da parte aérea (B) de plantas de girassol, em função das doses de Ni e valores de saturação em bases (V%) do solo.

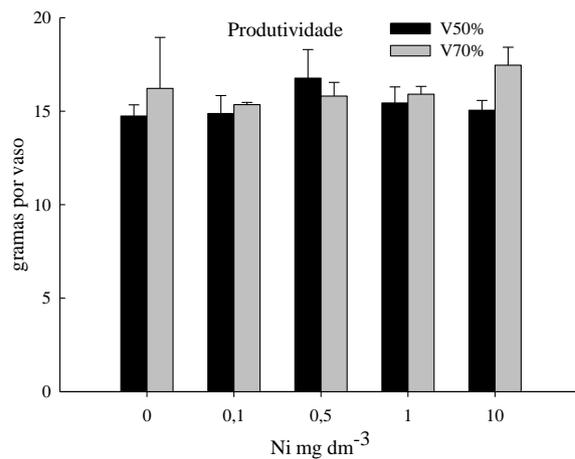


Figura 14. Produção de massa seca de grãos de plantas de girassol, em função das doses de Ni e dos níveis de saturação por bases (V%) do solo.

#### *Análises químicas de tecido vegetal (macro e micronutrientes)*

##### *Soja - Folha diagnose*

O teor de nitrogênio nas folhas utilizadas para diagnose não foi influenciado pelas saturações por bases e pela interação dos fatores, de modo que, foi realizado o teste de tukey para doses de Ni separadamente para cada saturação por bases (Tabela 1). No caso do V50% apenas no tratamento controle (0,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni) as plantas apresentaram teor de N cerca de 30% inferior àquelas cultivadas sob 0,1 mg dm<sup>-3</sup> de Ni. Na V70% as plantas do tratamento controle apresentaram concentração de N 34% menor em relação ao verificado no tratamento 0,5 mg dm<sup>-3</sup> de Ni, que apresentou a maior concentração de N (14,18 g kg<sup>-1</sup>). Esses resultados apontam para necessidade da suplementação com Ni quando da utilização da saturação por bases de 70%, para maior concentração de N nas folhas. A maior concentração de N nas folhas das plantas de soja que receberam Ni pode ocorrer em função da maior eficiência da atividade da urease que atua na ciclagem do N em folhas em senescentes posterior ao catabolismo da arginina, gerando ureia no citosol (WITTE, 2011). A partir do estágio V6 as primeiras folhas do terço inferior da planta iniciam o processo de senescencia (RITCHIE et al., 1994), de modo que no início do período reprodutivo a redistribuição e realocação de nutrientes ocorrem de modo acentuado, uma vez que as folhas do terço médio e superior devem suprir drenos como flores e posteriormente frutos, dos quais elas possuem conexões (TAIZ; ZEIGER, 2010).

A concentração de P nas folhas diagnósticas da soja foi influenciada pela saturação por bases e pela interação entre as saturações e as doses de Ni, ao passo que, o efeito isolado

das doses de Ni não interferiram nos teores de P. A V70% proporcionou maior concentração de P nas folhas diagnósticas da soja, justificado pela clássica diferença de P disponível em função da acidez do solo (GAMA-RODRIGUES et al., 2014), em que solos mais ácidos tendem a apresentar quantidades de P menos disponíveis. No caso do efeito da interação entre as saturações por bases e as doses de Ni foi observado diferença apenas na V70%, em que as maiores doses de Ni aplicadas proporcionaram menores concentrações de P nas folhas diagnósticas de soja.

O teor de K das folhas diagnósticas foi influenciado pelas saturações por bases e pelas doses de Ni. Plantas cultivadas sob V70% apresentaram maior concentração de K em comparação as plantas cultivadas sob V50%, contudo, não apresentaram diferenças quanto as doses de Ni. Nas plantas cultivadas sob V50% a concentração de K foi maior no tratamento que não recebeu Ni (controle), não diferindo das plantas que receberam  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni sob mesma saturação por bases. Embora o teor de K do solo foi classificado como médio (RAIJ et al., 1997) a aplicação de 150 ppm de K por vaso (Malavolta, 1980) proporcionou plantas de soja com teores foliares de K 60% superior ao limite máximo da faixa considerada adequada de acordo com Malavolta et al. (1997).

O Ca teve sua absorção influenciada pelos dois fatores e por suas interações, contudo, apenas as plantas dos tratamentos controle e  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni sob V50% apresentaram teores foliares de Ca considerados adequados de acordo com Malavolta et al. (1997), nos demais tratamentos as plantas excederam essa faixa. Na V50% as maiores doses de Ni proporcionaram plantas com maior concentração de Ca nas folhas, enquanto na V70% a dose de  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni proporcionou plantas com maior concentração de Ca nas folhas. Ao contrário do Ca, nenhum dos tratamentos apresentou teores foliares adequados de Mg de acordo com Malavolta et al. (1997). Este elemento foi influenciado pelas saturações por base, doses de Ni, bem como suas interações. Na V50% verificou-se plantas com maior concentração de Mg nas folhas nas maiores doses de Ni aplicado. Embora a quantidade de Ca e Mg tenha sido igualmente balanceada em todos os tratamentos, o efeito da maior absorção de cátions foi observado na V70%. Este efeito pode ser justificado pelo maior disponibilidade dos elementos sob pH do solo mais elevado.

A literatura apresenta trabalhos em que o Ni exerce influencia negativa sobre a absorção de alguns macronutrientes tais como Mg, como reportado por Piccini; Malavolta (1992) em trabalho realizado com cultivares de feijão; e mais frequentemente o Ca (BARSUKOVA; GAMZIKOVA, 1999). Porém, neste estudo não foi observada influência do Ni na concentração dos macronutrientes avaliados. A concentração de Ni nas doses utilizadas,

por se tratarem de “doses nutricionais” (não objetivando avaliar efeitos tóxicos com as doses utilizadas) pode justificar esta resposta, muito embora Sreekanth et al. (2013) relataram em sua revisão de literatura efeitos contraditórios quanto ao desequilíbrio nutricional das plantas em função da presença e concentração de Ni no tecido vegetal.

Embora apresente valência diferenciada do Ca na forma disponível no solo (o enxofre é absorvido preferencialmente na forma de sulfato –  $\text{SO}_4^{-2}$ ) e não tenha sido influenciado pelas saturações por bases e doses de Ni separadamente, o teor de S apresentou comportamento também semelhante ao cálcio, seja pelas maiores doses de Ni na V50% proporcionaram plantas com maiores concentrações de S e, pelas doses intermediárias de Ni aplicadas na V70% proporcionaram plantas com maiores concentrações de S nas folhas diagnósticas.

Tabela 1. Concentração de macronutrientes ( $\text{g kg}^{-1}$ ) em folhas diagnósticas de soja submetidas a doses de níquel e saturações por base (V%) do solo.

		Doses de Ni				
		$0,0 \text{ mg dm}^{-3}$	$0,1 \text{ mg dm}^{-3}$	$0,5 \text{ mg dm}^{-3}$	$1,0 \text{ mg dm}^{-3}$	$10,0 \text{ mg dm}^{-3}$
		----- $\text{g kg}^{-1}$ -----				
N	V50% <sup>a</sup>	9,31 ± 2,06 <sup>B</sup>	13,25 ± 1,35 <sup>A</sup>	11,24 ± 0,98 <sup>AB</sup>	10,73 ± 1,62 <sup>AB</sup>	11,08 ± 2,07 <sup>AB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	9,36 ± 1,69 <sup>B</sup>	11,59 ± 1,78 <sup>AB</sup>	14,18 ± 0,62 <sup>A</sup>	9,80 ± 2,88 <sup>B</sup>	10,91 ± 2,29 <sup>AB</sup>
P	V50% <sup>b</sup>	4,10 ± 0,32 <sup>bA</sup>	4,25 ± 0,37 <sup>bA</sup>	4,40 ± 1,14 <sup>aA</sup>	4,70 ± 0,25 <sup>aA</sup>	4,29 ± 0,53 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	5,98 ± 0,49 <sup>aA</sup>	5,61 ± 0,43 <sup>aA</sup>	4,99 ± 0,23 <sup>aAB</sup>	5,02 ± 0,44 <sup>aAB</sup>	4,28 ± 0,19 <sup>aB</sup>
K	V50% <sup>a</sup>	43,50 ± 3,70 <sup>aA</sup>	35,25 ± 6,24 <sup>bB</sup>	36,25 ± 1,71 <sup>aAB</sup>	35,75 ± 1,71 <sup>aB</sup>	30,25 ± 4,11 <sup>bB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	34,00 ± 2,94 <sup>bA</sup>	41,00 ± 2,16 <sup>aA</sup>	38,50 ± 5,80 <sup>aA</sup>	40,25 ± 2,62 <sup>aA</sup>	38,25 ± 2,87 <sup>aA</sup>
Ca	V50% <sup>b</sup>	17,73 ± 3,65 <sup>bBC</sup>	16,95 ± 0,29 <sup>bC</sup>	24,80 ± 0,87 <sup>aAB</sup>	20,95 ± 1,93 <sup>bABC</sup>	26,24 ± 5,22 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	26,12 ± 2,28 <sup>aAB</sup>	22,40 ± 4,28 <sup>aAB</sup>	25,17 ± 5,66 <sup>aAB</sup>	29,70 ± 4,89 <sup>aA</sup>	21,25 ± 2,02 <sup>aB</sup>
Mg	V50% <sup>b</sup>	1,72 ± 0,09 <sup>bB</sup>	1,98 ± 0,05 <sup>bAB</sup>	1,98 ± 0,23 <sup>aAB</sup>	2,25 ± 0,17 <sup>aA</sup>	2,23 ± 0,41 <sup>bAB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	2,83 ± 0,33 <sup>aA</sup>	2,52 ± 0,13 <sup>aAB</sup>	2,17 ± 0,39 <sup>aB</sup>	2,57 ± 0,34 <sup>aAB</sup>	2,88 ± 0,10 <sup>aA</sup>
S	V50% <sup>a</sup>	1,90 ± 0,34 <sup>aBC</sup>	1,93 ± 0,36 <sup>aBC</sup>	1,61 ± 0,35 <sup>bC</sup>	2,74 ± 0,63 <sup>aA</sup>	2,51 ± 0,44 <sup>aAB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	1,90 ± 0,21 <sup>aA</sup>	1,89 ± 0,28 <sup>aA</sup>	2,52 ± 0,05 <sup>aA</sup>	2,01 ± 0,35 <sup>bA</sup>	2,11 ± 0,17 <sup>aA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. N(<sup>ns</sup>)(<sup>\*\*</sup>)(<sup>ns</sup>); P(<sup>\*\*</sup>)(<sup>ns</sup>)(<sup>\*\*</sup>); K (<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>)(<sup>\*\*</sup>); Ca(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>); Mg(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*</sup>)(<sup>\*</sup>); S(<sup>ns</sup>)(<sup>\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>). <sup>ns</sup> = não significativo. <sup>\*\*</sup> significativo ao nível de 1% de probabilidade. <sup>\*</sup> significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

Quanto aos micronutrientes (Tabela 2), a concentração de Cu nas folhas de soja foi influenciada somente pelo efeito isolado das saturações por bases e pelas doses de Ni, de modo que não ocorreu interação entre os fatores. Na V50% as plantas apresentaram menores concentrações de Cu nas folhas quando comparadas àquelas cultivadas sob saturação de 70%. A partir do teste de médias realizado para cada saturação por bases, verificou-se que as doses de Ni também não influenciaram na concentração de Cu em folhas de soja quando estas foram cultivadas no solo sob saturação por bases de 50%, ao passo que para as plantas cultivadas sob saturação por bases de 70% as maiores doses de Ni proporcionaram maior concentração de Cu neste tecido vegetal. Alguns autores reportaram a possibilidade de ocorrer inibição competitiva entre  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  a partir do efeito interiônico de absorção (TIFFIN, 1971, KÖRNER et al., 1987, UREN, 1992), porém efeito inverso foi verificado, no qual plantas cultivadas sob saturação de 70% e com as maiores doses de Ni apresentaram maior concentração de Cu nas folhas, ressaltando a o efeito contraditório relatado por Sreekanth et al. (2013), quanto aos efeitos do Ni na nutrição mineral de plantas.

Semelhante ao Cu, a concentração de Fe nas folhas de soja também não foi influenciada pela interação entre os fatores, mas apenas pelo efeito isolado de cada fator. Na condição de saturação por bases de 50% observou-se plantas com maior concentração de Fe comparado aquelas cultivadas sob saturação por bases de 70%, neste caso, a relação clássica da disponibilidade de nutrientes no solo em função do pH pode justificar o resultado. A influência das doses de Ni na concentração de Fe foi observada apenas na V50%, cuja maior concentração de Fe foi observada nas plantas cultivadas com  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni, observando-se um teor de Fe 47% maior em relação ao tratamento controle ( $0,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ). A concentração de Mn nas folhas de soja foi influenciada somente pelas saturações por bases, das quais a V50% resultou em plantas com maior concentração de Mn, diferente do Zn que teve seu teor nas folhas de soja influenciado apenas pelo efeito isolado das doses de Ni, sendo a dose de Ni de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  aquela que proporcionou plantas com maior concentração de Zn nas folhas em ambas saturações por bases. Os tratamentos utilizados não influenciaram a concentração de B nas folhas de soja.

O Ni teve sua concentração nas folhas de soja influenciada pelos dois fatores e pela interação destes. Nas doses de 0,5, 1,0 e  $10,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni foi verificado que a concentração de Ni nas folhas foi respectivamente 6,2; 5,4 e 5,4 vezes maiores no cultivo sob saturação por bases de 50% em comparação a de 70% para as mesmas doses de Ni, indicando forte influencia desse fator sobre a concentração do elemento. Em relação as doses verificou-se que a aplicação de  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  não proporcionou aumento sobre a concentração do elemento nas

folhas de soja em relação ao tratamento controle, independente da saturação por bases a qual a planta foi submetida. A maior dose de Ni aplicada proporcionou teores foliares do elemento 12 e 33 vezes maiores que o tratamento controle sob as saturações por base de 70 e 50% respectivamente.

Tabela 2. Concentração de micronutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em folhas diagnósticas de soja submetidas a doses de níquel e saturações por base (V%)

		Doses de níquel				
		0,0 $\text{mg dm}^{-3}$	0,1 $\text{mg dm}^{-3}$	0,5 $\text{mg dm}^{-3}$	1,0 $\text{mg dm}^{-3}$	10,0 $\text{mg dm}^{-3}$
		----- $\text{mg kg}^{-1}$ -----				
Cu	V50% <sup>b</sup>	2,83 ± 1,67 <sup>A</sup>	2,94 ± 1,00 <sup>A</sup>	4,62 ± 1,69 <sup>A</sup>	3,65 ± 1,53 <sup>A</sup>	5,36 ± 0,54 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	4,95 ± 0,71 <sup>AB</sup>	2,70 ± 2,01 <sup>B</sup>	5,84 ± 0,38 <sup>A</sup>	5,25 ± 0,43 <sup>A</sup>	5,78 ± 0,76 <sup>A</sup>
Fe	V50% <sup>a</sup>	210,56 ± 24,11 <sup>C</sup>	400,25 ± 17,86 <sup>A</sup>	290,36 ± 27,96 <sup>B</sup>	247,49 ± 17,19 <sup>BC</sup>	260,17 ± 63,45 <sup>BC</sup>
	V70% <sup>b</sup>	216,82 ± 48,87 <sup>A</sup>	273,09 ± 67,83 <sup>A</sup>	277,22 ± 76,84 <sup>A</sup>	218,74 ± 61,45 <sup>A</sup>	212,77 ± 46,51 <sup>A</sup>
Mn	V50% <sup>a</sup>	95,44 ± 9,27 <sup>A</sup>	101,51 ± 19,05 <sup>A</sup>	112,47 ± 34,76 <sup>A</sup>	109,72 ± 20,78 <sup>A</sup>	92,93 ± 8,37 <sup>A</sup>
	V70% <sup>b</sup>	77,86 ± 6,12 <sup>A</sup>	77,97 ± 15,19 <sup>A</sup>	85,51 ± 29,48 <sup>A</sup>	100,72 ± 39,66 <sup>A</sup>	59,46 ± 2,91 <sup>A</sup>
Zn	V50% <sup>a</sup>	30,63 ± 1,62 <sup>B</sup>	46,42 ± 6,05 <sup>B</sup>	67,70 ± 9,67 <sup>A</sup>	44,8 ± 12,10 <sup>B</sup>	38,78 ± 10,55 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	36,51 ± 2,77 <sup>B</sup>	42,51 ± 3,54 <sup>AB</sup>	53,19 ± 7,92 <sup>A</sup>	44,84 ± 7,87 <sup>AB</sup>	42,71 ± 4,43 <sup>AB</sup>
B	V50% <sup>a</sup>	54,05 ± 11,31 <sup>A</sup>	63,28 ± 12,24 <sup>A</sup>	65,35 ± 5,54 <sup>A</sup>	72,00 ± 15,51 <sup>A</sup>	55,63 ± 16,04 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	66,28 ± 13,71 <sup>A</sup>	60,45 ± 8,36 <sup>A</sup>	71,19 ± 5,82 <sup>A</sup>	64,58 ± 6,72 <sup>A</sup>	64,05 ± 6,00 <sup>A</sup>
Ni	V50% <sup>a</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>aC</sup>	0,59 ± 0,07 <sup>aC</sup>	4,67 ± 0,74 <sup>aB</sup>	5,00 ± 0,44 <sup>aB</sup>	19,83 ± 2,33 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,31 ± 0,23 <sup>aB</sup>	0,62 ± 0,13 <sup>aB</sup>	0,75 ± 0,16 <sup>bB</sup>	0,92 ± 0,07 <sup>bB</sup>	3,67 ± 1,35 <sup>bA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. Cu(\*)(\*\*)(<sup>ns</sup>); Fe (\*)(\*\*)(<sup>ns</sup>); Mn (\*\*)(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); Zn (<sup>ns</sup>)(\*\*)(<sup>ns</sup>); B(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); Ni (\*\*)(\*\*)(\*\*). <sup>ns</sup> = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

## Soja - parte aérea

A concentração de N da parte aérea da soja não foi influenciada pelos tratamentos e apresentou valores na ordem de 11,34 a 14,42 g kg<sup>-1</sup> (Tabela 3) de matéria seca nos tratamentos avaliados.

Tabela 3. Concentração de macro e micronutrientes na parte aérea de soja submetidos a doses de níquel e saturações por base (V%)

		Doses de Ni									
		0,0 mg dm <sup>-3</sup>		0,1 mg dm <sup>-3</sup>		0,5 mg dm <sup>-3</sup>		1,0 mg dm <sup>-3</sup>		10,0 mg dm <sup>-3</sup>	
		g kg <sup>-1</sup>									
N	V50% <sup>a</sup>	13,23	± 2,51 <sup>A</sup>	11,34	± 1,36 <sup>A</sup>	12,58	± 1,66 <sup>A</sup>	13,79	± 1,37 <sup>A</sup>	11,88	± 1,63 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	12,51	± 2,10 <sup>A</sup>	13,58	± 0,93 <sup>A</sup>	12,43	± 1,25 <sup>A</sup>	12,88	± 1,33 <sup>A</sup>	14,42	± 1,56 <sup>A</sup>
Ca	V50% <sup>b</sup>	4,13	± 0,67 <sup>BB</sup>	4,57	± 0,74 <sup>bAB</sup>	5,11	± 0,85 <sup>aAB</sup>	5,51	± 0,61 <sup>aAB</sup>	6,03	± 1,09 <sup>bA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	7,45	± 0,58 <sup>aA</sup>	6,32	± 0,52 <sup>aAB</sup>	6,03	± 0,63 <sup>aAB</sup>	5,10	± 1,07 <sup>aB</sup>	7,52	± 0,87 <sup>aA</sup>
Mg	V50% <sup>a</sup>	2,73	± 0,99 <sup>B</sup>	4,42	± 0,38 <sup>A</sup>	4,42	± 0,81 <sup>A</sup>	3,34	± 0,68 <sup>AB</sup>	4,16	± 0,17 <sup>A</sup>
	V70% <sup>b</sup>	3,00	± 0,31 <sup>A</sup>	2,59	± 0,30 <sup>A</sup>	3,67	± 1,30 <sup>A</sup>	3,17	± 0,67 <sup>A</sup>	3,68	± 0,96 <sup>A</sup>
		mg kg <sup>-1</sup>									
Cu	V50% <sup>b</sup>	5,01	± 0,91 <sup>BB</sup>	6,04	± 1,65 <sup>bAB</sup>	6,94	± 1,67 <sup>aAB</sup>	6,59	± 1,04 <sup>bAB</sup>	8,12	± 0,84 <sup>bA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	10,98	± 0,90 <sup>aA</sup>	9,74	± 1,38 <sup>aAB</sup>	7,65	± 1,42 <sup>aB</sup>	9,18	± 1,67 <sup>aAB</sup>	11,32	± 1,61 <sup>aA</sup>
Zn	V50% <sup>a</sup>	19,59	± 4,24 <sup>BC</sup>	18,33	± 1,98 <sup>BC</sup>	25,17	± 4,40 <sup>aBC</sup>	34,82	± 5,15 <sup>aA</sup>	30,14	± 7,47 <sup>aAB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	27,06	± 3,07 <sup>aAB</sup>	25,9	± 5,66 <sup>aAB</sup>	23,54	± 1,25 <sup>aB</sup>	34,22	± 2,61 <sup>aA</sup>	28,00	± 2,57 <sup>aAB</sup>
Mn	V50% <sup>a</sup>	61,54	± 6,78 <sup>aA</sup>	60,83	± 6,75 <sup>aA</sup>	62,90	± 4,47 <sup>aA</sup>	57,83	± 6,05 <sup>aAB</sup>	48,30	± 3,65 <sup>aB</sup>
	V70% <sup>b</sup>	42,51	± 3,84 <sup>bA</sup>	36,96	± 4,34 <sup>bA</sup>	39,77	± 3,11 <sup>bA</sup>	36,79	± 2,93 <sup>bA</sup>	42,95	± 3,96 <sup>aA</sup>
Fe	V50% <sup>b</sup>	57,38	± 9,24 <sup>B</sup>	52,68	± 9,59 <sup>B</sup>	59,95	± 6,38 <sup>B</sup>	81,15	± 4,97 <sup>A</sup>	70,36	± 10,83 <sup>AB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	118,14	± 11,45 <sup>A</sup>	109,83	± 7,94 <sup>A</sup>	110,88	± 1,62 <sup>A</sup>	120,25	± 10,72 <sup>A</sup>	123,82	± 8,06 <sup>A</sup>
Ni	V50% <sup>a</sup>	0,47	± 0,14 <sup>aC</sup>	0,73	± 0,12 <sup>aC</sup>	1,61	± 0,54 <sup>aBC</sup>	2,44	± 0,10 <sup>aB</sup>	10,43	± 1,47 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,29	± 0,06 <sup>aC</sup>	0,41	± 0,04 <sup>aC</sup>	0,79	± 0,17 <sup>aC</sup>	2,58	± 1,03 <sup>aB</sup>	6,98	± 1,09 <sup>bA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. N<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); Ca<sup>(ns)</sup>(\*)(\*\*); Mg<sup>(\*\*)</sup>(\*\*)(\*); Cu<sup>(ns)</sup>(\*)(\*\*); Mn<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(\*\*); Zn<sup>(ns)</sup>(\*\*)(<sup>ns</sup>); Ni<sup>(\*\*)</sup>(\*\*)(\*); Fe<sup>(\*\*)</sup>(\*\*)(<sup>ns</sup>). <sup>ns</sup> = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

Saturações por bases, doses de Ni e a interação destes fatores influenciaram a concentração de Ca da parte aérea da soja. Plantas cultivadas sob saturação por bases de 50%

apresentaram menores concentrações de Ca quando não se aplicou Ni ao solo. As maiores concentrações de Ca na parte aérea da soja ocorreram em plantas cultivadas com as maiores doses de Ni nas duas saturações por bases avaliadas, no caso das plantas cultivadas sob saturação por bases de 70%, estas não diferiram do tratamento controle.

Apenas os efeitos isolados das saturações por bases e das doses de Ni contribuíram para as diferentes concentrações de Mg na parte aérea da soja. Ao contrário do Ca, a concentração de Mg foi maior em plantas cultivadas sob saturação por bases de 50%. A partir do desdobramento das doses de Ni para cada saturação por bases verificou-se que sob saturação por bases de 70% as doses de Ni influenciam igualmente a concentração de Mg da parte aérea da soja. Plantas cultivadas sob saturação de 50% apresentaram menor concentração de Mg na parte aérea na menor dose de Ni, estas por sua vez não diferiram das plantas cultivadas com as doses de  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni.

Embora em concentrações diferentes, as proporções de Cu, Zn e Fe na parte aérea da soja foram influenciadas de modo semelhante em função dos tratamentos, nos quais as plantas cultivadas sob saturação por bases de 70% apresentaram maiores concentrações destes metais na parte aérea. O oposto correu com o Mn que apresentou maiores concentrações em plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% com as menores doses de Ni. Já as plantas cultivadas sob saturação por bases de 70%, o tratamento controle e a maior dose de Ni proporcionaram plantas com mesma concentração de Mn na parte aérea. Embora a literatura apresente relação competitiva entre cátions bi-valentes (CATALDO et al., 1978; MALAVOLTA, 2006) de modo geral os micronutrientes com valências  $2^+$  apresentaram maiores concentrações na parte aérea de plantas de soja cultivadas com as maiores doses de Ni.

O Ni apresentou resultados de concentração na parte aérea das folhas de soja semelhantes aos observados nas folhas diagnósticas, de modo que as primeiras doses de Ni ( $0,0$  a  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni) proporcionaram pouca variação nos teores do elemento, ao passo que a dose de  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni apresentou plantas com o teor do elemento 22 e 24 vezes maior que o tratamento controle sob as saturações por bases de 50 e 70% respectivamente.

#### *Soja - Nódulos*

A concentração de N nos nódulos (Tabela 4) de soja não foi influenciada pelos tratamentos. Contudo, esses valores expressam apenas a quantidade de N presente nos nódulos no momento da coleta. A velocidade de fixação de N e distribuição para os demais órgãos da planta podem expressar resultados diferentes. Harper (1974) verificou que o pico da

fixação de N ocorre entre final do florescimento e o enchimento de grãos, de modo que o período avaliada pode justificar a semelhança entre os tratamentos. Contudo, Dalton et al., (1985) estudaram o efeito do Ni na nodulação da soja e verificaram acréscimos na atividade da nitrogenase nos nódulos em coleta realizada aos 52 d.a.e. das plantas, todavia, não verificaram esse efeito quando analisaram os nódulos aos 100 d.a.e. Essa maior atividade da nitrogenase nos primeiros estádios da soja, identificada pelos autores, pode proporcionar maior concentração de N nas folhas que por consequência serão realocados aos grãos. O N pode ainda ser redistribuído de folhas mais velhas (em senescência) para folhas mais jovens, neste caso, o Ni também exerce importante papel por meio da atividade da urease nas folhas (WITTE, 2011). A concentração de N variou entre os tratamentos de 19,35 a 27,18 g Kg.

As concentrações de Ca nos nódulos não foram influenciadas pelas saturações por bases avaliadas, sendo somente as doses de Ni e a interação entre doses e saturações por bases que exerceram efeito sobre o elemento. As plantas cultivadas sob saturação por bases de 70% foram similares quanto à concentração de Ca nos nódulos em todas as doses de Ni aplicadas, enquanto as plantas cultivadas sob saturação de 50%, a maior dose de Ni (10 mg dm<sup>-3</sup>) proporcionou maior concentração de Ca nos nódulos. Estudos como o de O'Hara et al., (1988) têm demonstrado que a deficiência de Ca prejudica a nodulação no período de pré-infecção da bactéria, enquanto Watkin et al., (1997) trabalhando com *Trifolium* spp. em condições de solo moderadamente ácido e e baixa concentração de Ca verificaram que o desenvolvimento da *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foi sensivelmente afetada de modo que os autores atribuíram esse efeito a deficiência de Ca. Os resultados observados nesse trabalho podem ter divergido da literatura clássica devido ao balanço de Ca e Mg realizado entre os tratamentos, o que ressalta a importância do Ca para nodulação indiferente do pH do solo. A deficiência de Ca também foi reportada por Blevins et al. (1977) como a causa da redução fixação biológica de nitrogênio em soja.

Diferente do esperado devido a concentração presente no solo, o Mg apresentou maior concentração nos nódulos, comparado ao Ca. Os dois fatores avaliados (saturação por bases e doses de Ni) bem como a interação destes, influenciaram a concentração do Mg nos nódulos, de modo que nas maiores doses de Ni aplicadas (10 mg dm<sup>-3</sup>) as plantas de soja apresentaram maiores concentrações de Mg indiferente da saturação por bases do solo. Chauhan et al. (1997) reportaram que a enzima delta aminoácido levulínico dehydratase (ALAD) presente e essencial em *B. japonicum* para formação do nódulo é dependente de Mg. O'hara (2001) em sua revisão de literatura reportou a importância do Mg para outras eubactérias (*E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*) como cofator de enzimas, estabilizador de membrana celular, ácidos

nucleicos e ribossomos, e embora esses estudos não foram aplicados em *B. japonicum* estes autores também associaram o Mg a sensibilidade das bactérias ao estresse ambiental, na qual verificaram que este é maior sob restrição de Mg. Neste sentido, a maior concentração de Mg verificada nas maiores doses de Ni pode ser uma resposta ao excesso de Ni as bactérias uma vez que, esta dose é 10 a 100 vezes maior que as demais doses utilizadas neste trabalho.

Tabela 4. Concentração de alguns macro e micronutrientes em nódulos de soja e níquel em raízes de soja submetidos a doses de níquel e saturações por base (V%)

		Doses de Ni				
		0,0 mg dm <sup>-3</sup>	0,1 mg dm <sup>-3</sup>	0,5 mg dm <sup>-3</sup>	1,0 mg dm <sup>-3</sup>	10,0 mg dm <sup>-3</sup>
		----- g kg <sup>-1</sup> -----				
N	V50% <sup>a</sup>	24,64 ± 2,19 <sup>A</sup>	19,35 ± 5,24 <sup>A</sup>	25,69 ± 1,18 <sup>A</sup>	24,41 ± 0,75 <sup>A</sup>	21,37 ± 1,78 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	26,81 ± 1,59 <sup>A</sup>	23,82 ± 1,70 <sup>A</sup>	25,53 ± 2,50 <sup>A</sup>	27,18 ± 1,44 <sup>A</sup>	25,20 ± 0,45 <sup>A</sup>
Ca	V50% <sup>a</sup>	2,36 ± 0,76 <sup>bb</sup>	2,00 ± 0,32 <sup>bb</sup>	3,20 ± 0,70 <sup>aB</sup>	2,94 ± 0,05 <sup>aB</sup>	5,31 ± 1,70 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	3,70 ± 0,49 <sup>aA</sup>	3,88 ± 1,34 <sup>aA</sup>	3,51 ± 1,00 <sup>aA</sup>	3,40 ± 0,45 <sup>aA</sup>	3,53 ± 0,03 <sup>bA</sup>
Mg	V50% <sup>b</sup>	5,05 ± 1,32 <sup>aAB</sup>	4,87 ± 0,37 <sup>aAB</sup>	4,25 ± 0,46 <sup>bb</sup>	4,47 ± 0,84 <sup>bb</sup>	6,28 ± 0,21 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	5,30 ± 0,36 <sup>aAB</sup>	4,53 ± 0,73 <sup>aB</sup>	5,98 ± 0,42 <sup>aAB</sup>	6,15 ± 0,45 <sup>aA</sup>	6,68 ± 0,77 <sup>aA</sup>
		----- mg kg <sup>-1</sup> -----				
Cu	V50% <sup>a</sup>	17,81 ± 9,58 <sup>aA</sup>	16,35 ± 2,08 <sup>aAB</sup>	9,84 ± 2,62 <sup>aBC</sup>	7,62 ± 0,22 <sup>aC</sup>	11,68 ± 1,01 <sup>aBC</sup>
	V70% <sup>a</sup>	10,5 ± 0,59 <sup>bb</sup>	13,78 ± 1,33 <sup>aAB</sup>	12,07 ± 4,12 <sup>aAB</sup>	11,14 ± 3,50 <sup>aAB</sup>	18,17 ± 0,25 <sup>aA</sup>
Zn	V50% <sup>a</sup>	20,32 ± 4,51 <sup>C</sup>	37,51 ± 4,15 <sup>A</sup>	24,42 ± 1,90 <sup>C</sup>	26,38 ± 2,72 <sup>BC</sup>	35,10 ± 5,73 <sup>AB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	27,87 ± 2,33 <sup>B</sup>	38,50 ± 2,28 <sup>A</sup>	27,59 ± 9,12 <sup>B</sup>	28,44 ± 4,88 <sup>AB</sup>	32,52 ± 1,81 <sup>AB</sup>
Mn	V50% <sup>a</sup>	6,48 ± 3,26 <sup>bb</sup>	18,81 ± 6,44 <sup>aAB</sup>	22,39 ± 8,01 <sup>aA</sup>	29,39 ± 6,86 <sup>aA</sup>	29,82 ± 9,00 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	27,62 ± 9,38 <sup>aA</sup>	19,7 ± 7,49 <sup>aA</sup>	17,40 ± 9,56 <sup>aA</sup>	16,11 ± 2,08 <sup>bA</sup>	20,75 ± 3,56 <sup>aA</sup>
Ni	V50% <sup>a</sup>	1,53 ± 0,79 <sup>aB</sup>	2,39 ± 0,51 <sup>aB</sup>	2,38 ± 1,05 <sup>aB</sup>	3,37 ± 0,61 <sup>aB</sup>	40,60 ± 7,41 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,84 ± 0,20 <sup>aB</sup>	0,54 ± 0,29 <sup>aB</sup>	1,65 ± 0,24 <sup>aB</sup>	3,91 ± 1,53 <sup>aB</sup>	28,71 ± 6,97 <sup>aA</sup>
Ni <sup>R</sup>	V50% <sup>a</sup>	0,65 ± 0,14 <sup>aB</sup>	1,34 ± 0,21 <sup>aB</sup>	1,46 ± 0,40 <sup>aB</sup>	2,47 ± 0,34 <sup>aB</sup>	20,44 ± 8,19 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,69 ± 0,17 <sup>aB</sup>	1,34 ± 0,21 <sup>aB</sup>	1,48 ± 0,29 <sup>aB</sup>	1,80 ± 0,40 <sup>aB</sup>	9,56 ± 1,28 <sup>bA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. N<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); Ca<sup>(ns)</sup>(\*)(\*\*); Mg(\*\*)(\*\*)(\*); Cu<sup>(ns)</sup>(\*)(\*\*); Mn<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(\*\*); Zn (<sup>ns</sup>)(\*\*)(<sup>ns</sup>); Ni(\*\*)(\*\*)(\*); Ni(\*\*)(\*\*)(\*\*). <sup>ns</sup> = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Ni<sup>R</sup>: níquel em raízes de soja. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

A concentração de Cu nos nódulos de soja não foi influenciada pelas saturações por bases avaliadas, de modo que apenas as doses de Ni e a interação destas com a saturação por bases contribuíram para alterar as concentrações deste metal. Plantas cultivadas sob a maior e menor dose de Ni aplicada nos tratamentos apresentaram resultados opostos no comparativo das duas saturações por bases avaliadas, de modo que na dose de 0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni a maior concentração de Cu foi observada nas plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% ao passo que na dose de 10 mg dm<sup>-3</sup> de Ni ocorreu o contrário. As demais doses de Ni apresentaram resultados semelhantes sob as duas saturações por bases.

Apenas as doses de Ni influenciaram a concentração de Zn nos nódulos de modo que foi realizado o desdobramento das doses de Ni para cada saturação por bases. Plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% oscilaram entre 20,32 e 37,51 mg kg<sup>-1</sup> de Zn nos nódulos de soja em função das doses de Ni. A maior concentração de Zn foi verificada nas plantas cultivadas com 0,1 mg dm<sup>-3</sup> de Ni, não diferindo das plantas cultivadas na dose de 10 mg dm<sup>-3</sup> de Ni. Resultado semelhante foi verificado quando se cultivou plantas sob saturação de 70% das quais apresentaram maior concentração do elemento no tratamento de 0,1 mg dm<sup>-3</sup> de Ni, não diferindo das doses de 0,5 e 10 mg dm<sup>-3</sup> de Ni. O Zn foi reportado por Chauhan et al., (1997) como ativador da enzima delta aminoácido levulínico dehidratase (ALAD), mais recentemente Weisany et al., (2013) descreveram em sua revisão de literatura que em alguns mutantes de *B. japonicum* o Zn pode substituir o Mg nessa enzima, como ocorre em animais.

O Mn foi o único elemento avaliado nos nódulos de soja que teve sua concentração influenciada apenas pela interação dos fatores estudados, de modo que o efeito isolado das doses de Ni e as saturações por bases não foram observados. O tratamento que recebeu 0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni foi o único que apresentou na saturação por bases de 50% menor concentração de Mn nos nódulos de soja se comparado as plantas cultivadas sob mesma dose de Ni e saturação de 70%. Para os demais tratamentos, sob mesma dose de Ni no comparativo entre as saturações por bases verificou maior concentração de Mn nos nódulos de plantas cultivadas sob saturação de 50%.

Semelhante as concentrações de Ni verificados nas folhas, a concentração de Ni nos nódulos foi influenciada pelos dois fatores avaliados e pela interação destes. Nas maiores doses de Ni aplicadas, a concentração de Ni nos nódulos também foi maior nas duas saturações por bases avaliadas. As demais doses proporcionaram plantas com conteúdo de Ni semelhantes nos nódulos. Verificou-se que a concentração de Ni nos nódulos foi sempre maior que aplicada no solo pelos tratamentos ao passo que plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% com a dose de 10 mg dm<sup>-3</sup> de Ni no solo concentraram Ni nos nódulos numa proporção quatro vezes superior a concentração no solo. Respostas a aplicação de Ni por soja com aumento no peso de

nódulos e sementes foram relatadas por Bertrand; Wolf (1967) que posteriormente foram relacionadas a síntese da hidrogenase (BUERKERT 1990) sequencial ao processo de nitrogenase (PAUL et al., 1989), Contudo, a literatura aponta para uma baixa exigência de Ni em suprimento as composição e ativação enzimática de modo que, níveis tóxicos também são alcançados em baixas doses como relatado por Dalton et al., (1985).

Embora a concentração de Ni nos nódulos de soja tenham alcançado valores expressivos no tratamento  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni sob saturação por bases de 50 e 70% em comparação aos demais tratamentos, ressalta-se que em nenhum período de avaliação foram identificados sintomas visuais de toxidez do elemento. Por fim, Polacco et al., (2013), em sua revisão de literatura, afirmaram que a dependência de plantas hospedeiras (como as leguminosas) por produtos da atividade enzimática de bactérias associadas é muito maior do que atualmente se conhece, pois algumas enzimas são produzidas por plantas e bactérias. Os mesmo autores ressaltam que a exigência de Ni pelos nódulos chega próximo a níveis tóxicos as plantas. Estudos futuros com mutantes nulos a estas enzimas podem evidenciar o maior dependência pelas bactérias bem como a maior demanda pelo Ni.

Em proporções médias de 50% menos de Ni que nos nódulos, a concentração de Ni nas raízes de soja ( $\text{Ni}^R$ ) foi influenciada pelas saturações por bases, doses de Ni e pela interação desses fatores. Quanto a distribuição de Ni nas raízes dentro de cada tratamento, esta seguiu a mesma ordem dos nódulos ao passo que as plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% apresentaram maior concentração de Ni nas raízes. A concentração de Ni nas raízes de soja nos tratamentos com doses entre  $0,0$  e  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni foram semelhantes. Esses valores reafirmam a maior demanda de Ni por nódulos em relação aos demais órgãos vegetativos das plantas.

#### *Soja – Grãos*

A concentração de N nos grão de soja seguiu modelo estatístico semelhante ao observado nas folhas, de modo que a dose de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni, com a saturação por bases de 70%, proporcionaram plantas com maiores teores de N nos grãos (Tabela 5). Dos tecidos de soja avaliados, os grãos foram os que apresentaram maiores teores de N. Esses valores ressaltam a importância do Ni no ciclo do N e, por consequência no teor de proteína dos grãos (VILLEGAS et al., 1985) e ainda aponta para possível necessidade de suplementação do elemento, uma vez que a soja apresentou resposta positiva quanto ao acréscimo de N em função da aplicação de Ni. Apenas na condição de ausência da adição das doses de Ni com a saturação por bases de 50%, as plantas apresentaram concentração de Ni nos grãos inferiores as das sementes utilizadas no

experimento. Esses valores também chamam atenção para a necessidade do monitoramento de áreas agrícolas comerciais destinadas à produção de sementes quanto ao conteúdo de Ni dos grãos. As sementes utilizadas no experimento são oriundas destas áreas e apresentaram na relação semente plantada/semente colhida, redução do teor de Ni dos grãos nas plantas cultivadas no tratamento controle. Esses valores ficaram abaixo do limite mínimo determinado por Kabata-Pendias e Pendias (2011) para grãos de soja.

Tabela 5. Concentração de N ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e Ni ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de soja submetidos a doses de Ni e saturações por base (V%)

		Doses de Ni				
		0,0 $\text{mg dm}^{-3}$	0,1 $\text{mg dm}^{-3}$	0,5 $\text{mg dm}^{-3}$	1,0 $\text{mg dm}^{-3}$	10,0 $\text{mg dm}^{-3}$
		----- $\text{g kg}^{-1}$ -----				
N	V50% <sup>b</sup>	27,70 $\pm$ 0,93 <sup>aA</sup>	28,18 $\pm$ 0,23 <sup>aA</sup>	27,72 $\pm$ 0,62 <sup>bA</sup>	28,84 $\pm$ 1,12 <sup>aA</sup>	27,73 $\pm$ 1,20 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	28,23 $\pm$ 0,81 <sup>aB</sup>	28,31 $\pm$ 0,62 <sup>aB</sup>	31,78 $\pm$ 0,14 <sup>aA</sup>	26,86 $\pm$ 0,73 <sup>bB</sup>	28,50 $\pm$ 1,19 <sup>aB</sup>
		----- $\text{mg kg}^{-1}$ -----				
Ni	V50% <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,21 <sup>aC</sup>	1,12 $\pm$ 0,32 <sup>aC</sup>	5,07 $\pm$ 0,70 <sup>aC</sup>	11,50 $\pm$ 1,65 <sup>bB</sup>	32,17 $\pm$ 4,08 <sup>bA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	0,70 $\pm$ 0,17 <sup>aC</sup>	1,99 $\pm$ 0,10 <sup>aD</sup>	7,46 $\pm$ 0,41 <sup>aC</sup>	29,88 $\pm$ 5,22 <sup>aB</sup>	38,04 $\pm$ 1,16 <sup>aA</sup>

N(\*)(\*\*)(\*\*); Ni(\*\*)(\*\*)(\*\*). <sup>ns</sup> = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

O teor de Ni nos grãos apresentou resultados contrastantes a todos os demais órgãos da planta uma vez que, a redistribuição ocorreu de forma desproporcional a concentração dos demais órgãos das plantas e em relação às saturações por bases utilizadas. Raíz, nódulo, PA e FD apresentaram maior concentração de Ni nas plantas cultivadas sob saturação por bases de 50%, entretanto, a concentração de Ni nos grãos foi maior em plantas cultivadas sob saturação por bases de 70%. Esses resultados sugerem que níveis foliares de Ni não necessariamente apresentem correlações com seus órgãos drenos (grãos). Dentre as características agrônômicas avaliadas as plantas cultivadas sob saturação por bases de 70% apresentaram os melhores resultados. A maior redistribuição do Ni para os grãos nestas plantas apontam para futuras descobertas sobre novas funções do Ni (BROWN, 2007), sobre os órgãos reprodutivos das plantas.

Desde que Dalton et al. (1988) demonstraram efeitos benéficos do Ni na germinação de sementes, as etapas de florescimento e frutificação das culturas têm sido estudadas quanto a influência positiva do Ni e, embora sua função não esteja totalmente elucidada, existem alguns trabalhos e questionamentos de alguns autores sobre estes efeitos. Malavolta et al. (2006)

verificaram que plantas de citrus no período reprodutivo acumularam mais de 50% do Ni em flores e frutos e indagaram quanto à capacidade do Ni em contribuir para o “pegamento” das flores. Como o Ni tem sido largamente estudado quanto aos seus efeitos tóxicos, algumas respostas fisiológicas podem ser encontradas em estudos de plantas hiperacumuladoras do elemento. Neste contexto, Gasemi et al. (2014) comprovaram o efeito do Ni no aumento do florescimento de *Alyssum inflatum* pela maior eficiência no ciclo do N e carbono (C) e ainda, indiretamente, pelo balanço de nutrientes. Ressalta-se que o Ni também tem sido relacionado com o ciclo do C em outros organismos (RAGSDALE, 2007).

### *Girassol – Folha diagnose*

O teor de N nas folhas diagnósticas de girassol foi influenciado somente pela interação dos fatores saturações por bases e doses de Ni, no qual observou-se respostas contrastantes de uma mesma dose de Ni quando comparadas sob cada saturação por bases estudada (Tabela 6). Desta forma, sob saturação por bases de 50%, verificou-se que a dose de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni proporcionou plantas com a menor concentração de N nas folhas de girassol. O contrário foi verificado quando se observou a mesma dose de Ni sob saturação por bases de 70%, em que as folhas diagnósticas de girassol apresentaram o maior teor de N. As plantas de girassol cultivadas sob todos os tratamentos apresentaram teores foliares de N abaixo da faixa de 30 a  $50 \text{ g kg}^{-1}$  considerada adequada para cultura (MALAVOLTA et al., 1989), no entanto, acima dos dos teores de N apresentados por Ahmad et al. (2011), que avaliaram dois cultivares de girassol também sob efeito do Ni.

Os dois fatores estudados no experimento, bem como a interação destes, foram determinante para concentração de P nas folhas de girassol. No caso das saturações por bases, observou-se maior concentração de P nas plantas cultivadas sob saturação de 70%, porém, as plantas cultivadas sob saturação de 50% na dose de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni apresentaram concentração de P nas folhas semelhante aos teores máximos obtidos nas plantas cultivadas sob saturação de 70%. Os teores de K nas folhas de girassol ficaram abaixo da faixa adequada, segundo Malavolta et al. (1989), apenas nos tratamentos  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni sob V50% e  $0,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni sob V70%, enquanto todos os tratamentos avaliados apresentaram plantas de girassol com teores foliares de Ca acima do adequado de acordo com a mesma tabela de referência. O teor de Mg foi influenciado pelos dois fatores em estudo e pela interação destes, a dose de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni foi a que proporcionou maior concentração de Mg nas folhas de girassol entre as doses de Ni avaliadas sob saturação de 50%, no entanto, não promoveu os teores máximos de Mg obtidos

pelas plantas cultivadas sob saturação de 70%. Semelhante ao Ca os teores de S foram muito superiores a faixa estabelecida por Malavolta et al., (1989) para a cultura do girassol.

Tabela 6. Concentração de macronutrientes em folhas diagnósticas de girassol submetidas a doses de níquel e saturações por base (V%)

		Doses de níquel				
		0,0 mg dm <sup>-3</sup>	0,1 mg dm <sup>-3</sup>	0,5 mg dm <sup>-3</sup>	1,0 mg dm <sup>-3</sup>	10,0 mg dm <sup>-3</sup>
		----- g kg <sup>-1</sup> -----				
N	V50% <sup>a</sup>	21,64 ± 1,87 <sup>aAB</sup>	22,38 ± 0,39 <sup>aAB</sup>	18,88 ± 4,56 <sup>bB</sup>	24,55 ± 2,52 <sup>aAB</sup>	24,82 ± 2,72 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	21,68 ± 2,12 <sup>aAB</sup>	22,68 ± 2,07 <sup>aA</sup>	24,36 ± 3,49 <sup>aA</sup>	16,40 ± 1,94 <sup>bB</sup>	21,86a ± 4,42 <sup>aAB</sup>
P	V50% <sup>b</sup>	1,60 ± 0,13 <sup>bB</sup>	1,54 ± 0,11 <sup>aB</sup>	2,04 ± 0,18 <sup>aA</sup>	1,68 ± 0,09 <sup>bB</sup>	1,58 ± 0,04 <sup>bB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	2,02 ± 0,07 <sup>aA</sup>	1,68 ± 0,08 <sup>aB</sup>	1,71 ± 0,23 <sup>bB</sup>	1,89 ± 0,10 <sup>aAB</sup>	2,12 ± 0,21 <sup>aA</sup>
K	V50% <sup>a</sup>	30,00 ± 2,45 <sup>aB</sup>	29,25 ± 3,50 <sup>bB</sup>	35,75 ± 4,50 <sup>aA</sup>	30,00 ± 0,82 <sup>bB</sup>	36,25 ± 1,26 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	29,75 ± 3,30 <sup>aB</sup>	36,00 ± 1,63 <sup>aA</sup>	30,25 ± 0,95 <sup>bB</sup>	34,25 ± 3,69 <sup>aAB</sup>	32,25 ± 2,06 <sup>bAB</sup>
Ca	V50% <sup>b</sup>	26,54 ± 6,50 <sup>A</sup>	24,03 ± 2,63 <sup>A</sup>	27,37 ± 7,73 <sup>A</sup>	24,13 ± 0,88 <sup>A</sup>	27,92 ± 2,46 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	33,13 ± 4,34 <sup>A</sup>	30,44 ± 2,27 <sup>A</sup>	34,96 ± 1,08 <sup>A</sup>	32,99 ± 3,63 <sup>A</sup>	28,24 ± 4,40 <sup>A</sup>
Mg	V50% <sup>b</sup>	1,79 ± 0,05 <sup>bB</sup>	1,71 ± 0,24 <sup>bB</sup>	2,34 ± 0,49 <sup>bA</sup>	1,82 ± 0,08 <sup>bAB</sup>	1,73 ± 0,14 <sup>bB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	3,10 ± 0,29 <sup>aA</sup>	2,45 ± 0,33 <sup>aB</sup>	3,10 ± 0,28 <sup>aA</sup>	3,52 ± 0,17 <sup>aA</sup>	2,49 ± 0,26 <sup>aB</sup>
S	V50% <sup>a</sup>	8,91 ± 1,36 <sup>aA</sup>	7,09 ± 0,94 <sup>aB</sup>	7,38 ± 0,59 <sup>aAB</sup>	7,07 <sup>aB</sup> ± 0,46 <sup>aB</sup>	6,78 ± 0,49 <sup>bB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	8,37 ± 0,85 <sup>aA</sup>	7,57 ± 0,90 <sup>aAB</sup>	8,36 ± 0,56 <sup>aAB</sup>	6,16 <sup>aB</sup> ± 1,16 <sup>aB</sup>	8,88 ± 0,68 <sup>aA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. N<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(<sup>\*\*</sup>); P(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>); K(<sup>ns</sup>)(<sup>\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>); Ca(<sup>\*\*</sup>)(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); Mg(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>); S(<sup>ns</sup>)(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*</sup>). <sup>ns</sup> = não significativo. <sup>\*\*</sup> significativo ao nível de 1% de probabilidade. <sup>\*</sup> significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

Quanto aos micronutrientes (Tabela 7), Cu e Zn tiveram seus teores foliares influenciados pelos tratamentos aplicados. As plantas que apresentaram maior acúmulo de Fe foram as cultivadas entre as doses 0,1 a 1,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni sob saturação por bases de 50%. Da mesma forma, o girassol apresentou maior teor de Mn nas folhas quando cultivado sob saturação de 50%, indiferente da dose aplicada. O contrário ocorreu com o B, no qual os maiores teores foram observados nas plantas sob saturação por bases de 70%, sendo que nesta

condição de cultivo as maiores doses de Ni aplicadas contribuíram para a diminuição do teor de B nas folhas. O Ni teve seus teores influenciados pelos dois fatores e a interação destes. Plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% apresentaram maiores teores de Ni nas folhas diagnósticas. As maiores doses de Ni aplicadas proporcionaram maiores teores foliares do elemento. A variação dos teores foliares de Ni nas plantas de girassol cultivadas sob as doses de Ni entre 0,0 e 1,0 mg dm<sup>-3</sup> foram pequenas, não diferindo estatisticamente. Entretanto, para a maior dose de Ni aplicada (10,0 mg dm<sup>-3</sup>) as plantas apresentaram teores foliares de Ni superior a 600% nas plantas cultivadas sob saturação por bases de 70% e quase 900% nas plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% em relação ao tratamento controle (sem adição de Ni). Esse mesmo contraste foi observado por Ahmad et al. (2011) na comparação das mesmas doses utilizadas em dois híbridos de girassol.

Tabela 7. Concentração de micronutrientes em folhas diagnósticas de girassol submetidas a doses de níquel e saturações por base (V%)

		Doses de níquel				
		0,0 mg dm <sup>-3</sup>	0,1 mg dm <sup>-3</sup>	0,5 mg dm <sup>-3</sup>	1,0 mg dm <sup>-3</sup>	10,0 mg dm <sup>-3</sup>
		mg kg <sup>-1</sup>				
Cu	V50% <sup>a</sup>	17,26 ± 3,01 <sup>A</sup>	13,71 ± 3,92 <sup>A</sup>	13,14 ± 3,66 <sup>A</sup>	11,25 ± 2,01 <sup>A</sup>	15,78 ± 4,05 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	14,36 ± 4,63 <sup>A</sup>	13,35 ± 1,86 <sup>A</sup>	12,21 ± 2,13 <sup>A</sup>	14,24 ± 2,83 <sup>A</sup>	14,29 ± 3,23 <sup>A</sup>
Fe	V50% <sup>a</sup>	140,38 ± 28,33 <sup>aAB</sup>	167,37 ± 16,68 <sup>aA</sup>	149,31 ± 10,31 <sup>aAB</sup>	160,55 ± 13,72 <sup>aA</sup>	129,17 ± 5,60 <sup>aB</sup>
	V70% <sup>b</sup>	140,66 ± 15,31 <sup>aA</sup>	141,31 ± 16,85 <sup>bA</sup>	115,83 ± 9,74 <sup>bA</sup>	134,64 ± 9,13 <sup>bA</sup>	134,61 ± 12,92 <sup>aA</sup>
Mn	V50% <sup>a</sup>	400,56 ± 23,32 <sup>A</sup>	515,10 ± 156,80 <sup>A</sup>	428,80 ± 98,04 <sup>A</sup>	575,51 ± 76,45 <sup>A</sup>	454,99 ± 19,69 <sup>A</sup>
	V70% <sup>b</sup>	395,03 ± 35,20 <sup>AB</sup>	287,47 ± 14,33 <sup>B</sup>	246,07 ± 19,89 <sup>B</sup>	467,72 ± 72,47 <sup>A</sup>	361,24 ± 156,61 <sup>AB</sup>
Zn	V50% <sup>a</sup>	73,95 ± 13,68 <sup>A</sup>	70,34 ± 12,52 <sup>A</sup>	62,38 ± 6,26 <sup>A</sup>	62,2 ± 9,18 <sup>A</sup>	71,70 ± 14,77 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	59,89 ± 11,57 <sup>A</sup>	48,63 ± 3,52 <sup>A</sup>	61,70 ± 12,33 <sup>A</sup>	66,47 ± 3,93 <sup>A</sup>	70,92 ± 6,54 <sup>A</sup>
B	V50% <sup>b</sup>	30,03 ± 1,37 <sup>bAB</sup>	35,10 ± 3,98 <sup>aAB</sup>	37,70 ± 2,66 <sup>aA</sup>	28,42 ± 4,96 <sup>bB</sup>	35,25 ± 2,78 <sup>aAB</sup>
	V70% <sup>a</sup>	38,40 ± 4,13 <sup>aAB</sup>	40,74 ± 4,95 <sup>aA</sup>	36,15 ± 7,97 <sup>aAB</sup>	35,89 ± 1,82 <sup>aAB</sup>	30,99 ± 1,49 <sup>aB</sup>
Ni	V50% <sup>a</sup>	3,34 ± 0,55 <sup>aB</sup>	3,56 ± 0,32 <sup>aB</sup>	3,33 ± 0,55 <sup>aB</sup>	4,95 ± 0,21 <sup>aB</sup>	29,02 ± 3,19 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	2,95 ± 0,27 <sup>aB</sup>	2,85 ± 0,08 <sup>aB</sup>	3,13 ± 0,25 <sup>aB</sup>	3,08 ± 0,15 <sup>bB</sup>	20,09 ± 1,21 <sup>bA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. Cu<sup>(ns)(ns)(ns)</sup>; Fe<sup>(\*\*)(\*)(\*)</sup>; Mn<sup>(\*\*)(\*\*)(ns)</sup>; Zn<sup>(ns)(ns)(ns)</sup>; B<sup>(\*)(\*)(\*)</sup>; Ni<sup>(\*\*)(\*\*)(\*)</sup>. ns = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

## Girassol parte aérea

Tabela 8. Concentração de macro e micronutrientes na parte aérea e de níquel nas raízes de plantas de girassol submetida a doses de níquel e saturações por base (V%)

		Doses de Ni									
		0,0 mg dm <sup>-3</sup>		0,1 mg dm <sup>-3</sup>		0,5 mg dm <sup>-3</sup>		1,0 mg dm <sup>-3</sup>		10,0 mg dm <sup>-3</sup>	
		g kg <sup>-1</sup>									
N	V50% <sup>a</sup>	8,44	± 0,17 <sup>aA</sup>	7,85	± 0,38 <sup>aAB</sup>	5,58	± 0,18 <sup>aB</sup>	7,01	± 0,58 <sup>aAB</sup>	6,58	± 1,26 <sup>aAB</sup>
	V70% <sup>b</sup>	6,34	± 2,93 <sup>baA</sup>	5,83	± 0,66 <sup>aA</sup>	7,16	± 1,17 <sup>aA</sup>	5,25	± 0,39 <sup>baA</sup>	5,78	± 1,20 <sup>aA</sup>
Ca	V50% <sup>a</sup>	11,37	± 0,94 <sup>aA</sup>	13,89	± 0,39 <sup>aA</sup>	11,60	± 1,39 <sup>aA</sup>	11,21	± 0,45 <sup>aA</sup>	15,74	± 0,66 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	13,92	± 1,63 <sup>aA</sup>	11,73	± 2,22 <sup>aA</sup>	14,19	± 3,83 <sup>aA</sup>	11,86	± 3,15 <sup>aA</sup>	11,4	± 1,49 <sup>baA</sup>
Mg	V50% <sup>b</sup>	3,23	± 0,97 <sup>baB</sup>	4,13	± 0,58 <sup>aAB</sup>	3,04	± 0,67 <sup>baB</sup>	2,58	± 0,38 <sup>baB</sup>	4,50	± 0,58 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	5,19	± 0,99 <sup>aA</sup>	4,93	± 0,17 <sup>aA</sup>	5,36	± 0,67 <sup>aA</sup>	5,56	± 1,35 <sup>aA</sup>	4,90	± 0,56 <sup>aA</sup>
		mg kg <sup>-1</sup>									
Cu	V50% <sup>a</sup>	5,59	± 2,60 <sup>A</sup>	4,65	± 1,79 <sup>A</sup>	2,04	± 0,53 <sup>A</sup>	3,72	± 0,48 <sup>A</sup>	2,80	± 1,23 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	3,79	± 1,82 <sup>A</sup>	2,12	± 0,52 <sup>A</sup>	4,22	± 1,90 <sup>A</sup>	3,29	± 1,89 <sup>A</sup>	2,07	± 0,37 <sup>A</sup>
Zn	V50% <sup>a</sup>	99,28	± 37,62 <sup>aAB</sup>	38,01	± 0,24 <sup>aC</sup>	32,64	± 0,10 <sup>aC</sup>	120,78	± 14,46 <sup>aA</sup>	50,75	± 9,28 <sup>baBC</sup>
	V70% <sup>a</sup>	86,28	± 22,72 <sup>aA</sup>	65,28	± 10,97 <sup>aA</sup>	60,36	± 4,41 <sup>aA</sup>	66,26	± 24,55 <sup>baA</sup>	93,00	± 14,83 <sup>aA</sup>
Mn	V50% <sup>a</sup>	362,22	± 135,28 <sup>aAB</sup>	157,64	± 25,92 <sup>aC</sup>	181,07	± 24,28 <sup>aC</sup>	407,14	± 53,96 <sup>aA</sup>	221,08	± 57,29 <sup>aBC</sup>
	V70% <sup>b</sup>	206,11	± 91,00 <sup>baA</sup>	204,17	± 1,92 <sup>caA</sup>	219,84	± 50,91 <sup>caA</sup>	177,42	± 6,65 <sup>baA</sup>	271,81	± 23,36 <sup>aA</sup>
Fe	V50% <sup>a</sup>	190,42	± 32,87 <sup>A</sup>	171,35	± 20,08 <sup>A</sup>	147,13	± 4,38 <sup>A</sup>	199,10	± 21,67 <sup>A</sup>	181,32	± 16,79 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	176,77	± 30,08 <sup>A</sup>	197,53	± 25,18 <sup>A</sup>	186,29	± 34,24 <sup>A</sup>	172,66	± 2,84 <sup>A</sup>	196,37	± 14,69 <sup>A</sup>
Ni	V50% <sup>a</sup>	0,00	± 0,00 <sup>aB</sup>	0,26	± 0,12 <sup>aB</sup>	0,85	± 0,74 <sup>aB</sup>	1,27	± 0,27 <sup>aB</sup>	10,56	± 2,30 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	0,69	± 0,10 <sup>aB</sup>	0,81	± 0,14 <sup>aB</sup>	1,03	± 0,17 <sup>aB</sup>	1,71	± 0,60 <sup>aB</sup>	5,22	± 1,79 <sup>baA</sup>
Ni <sup>R</sup>	V50% <sup>a</sup>	3,01	± 0,18 <sup>aB</sup>	4,66	± 0,42 <sup>aB</sup>	5,87	± 0,21 <sup>aB</sup>	9,48	± 1,04 <sup>aB</sup>	49,51	± 9,53 <sup>aA</sup>
	V70% <sup>b</sup>	2,90	± 0,61 <sup>aB</sup>	3,17	± 0,53 <sup>aB</sup>	5,06	± 1,55 <sup>aB</sup>	6,87	± 1,80 <sup>aB</sup>	30,02	± 5,78 <sup>baA</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. N(\*)<sup>(ns)</sup>(\*)<sup>(\*)</sup>; Ca<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)<sup>(\*)</sup>(\*)<sup>(\*)</sup>; Mg<sup>(\*\*)</sup>(<sup>ns</sup>)<sup>(\*)</sup>(\*)<sup>(\*)</sup>; Cu<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)<sup>(\*)</sup>; Zn<sup>(ns)</sup>(<sup>\*\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>(<sup>\*\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>; Mn<sup>(\*)</sup>(<sup>\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>(<sup>\*\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>; Fe<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)<sup>(ns)</sup>; Ni<sup>(\*)</sup>(<sup>\*\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>(<sup>\*\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>; Ni<sup>R</sup><sup>(\*\*)</sup>(<sup>\*\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>(<sup>\*\*</sup>)<sup>(\*\*)</sup>. ns = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

As saturações por bases utilizadas bem como as doses de Ni influenciaram diretamente a concentração dos nutrientes da parte aérea do girassol (Tabela 8). Dos oito elementos analisados três deles (N, Ni e Mn) apresentaram maiores concentrações na parte aérea das

plantas cultivadas sob saturação por bases de 50%; um (Mg), em nas plantas sob saturação por bases de 70% e; outros quatro (Ca, Cu, Fe e Zn) não foram influenciados por esse fator. Apenas três elementos (Zn, Mn e Ni) tiveram seus teores na parte aérea do girassol alterados em função das doses de Ni aplicadas e, somente as concentrações de Fe e Cu não foram alteradas pela interação dos fatores (saturação por bases e doses de Ni).

O N da parte aérea das plantas de girassol cultivadas sob saturação por base de 50% diferiu apenas entre o tratamento controle e a dose de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni, contudo, foram semelhantes aos demais tratamentos. Já as plantas cultivadas sob saturação por bases de 70% foram semelhantes quanto aos teores de N da parte aérea.

Apenas a dose de  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni e a saturação por bases de 70% incidiram negativamente quanto aos teores de Ca da PA do girassol, de modo que os demais tratamentos foram semelhantes. O Mg diferiu quanto a concentração na parte aérea do girassol apenas no comparativo entra as duas saturações por bases no tratamento controle e na saturação por bases de 50% entre as doses de  $1,0$  e  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni.

As plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% com  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni apresentaram maior concentração de Zn e Mn na PA do girassol, porém não diferiram do tratamento controle sob mesma saturação por bases. A concentração de Ni na PA do girassol foi inferior àquela verificada nas FD, todavia, seguiu distribuição estatística semelhante na qual, a saturação por bases de 50% proporcionou plantas com maior concentração de Ni e a dose máxima de Ni aplica diferiu das demais. Semelhante aos demais órgãos da planta, porém, em concentrações muito maiores, o Ni nas raízes de girassol ( $\text{Ni}^R$ ) foi influenciado pelos dois fatores isolados, bem como pela interação deles. A saturação por bases de 50% proporcionou plantas com maior teor de Ni nas raízes assim maior doses de Ni aplicadas ( $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni) foi superior as demais doses. Os valores observados nas plantas de girassol seguem a premissa de Chen et al. (2009), da qual cerca de 50% do total do Ni das plantas se concentram nas raízes

#### *Girassol grãos*

A concentração de N nos grãos de girassol não foi afetada pelos tratamentos (Tabela 9). Os grãos apresentaram teor de N muito próximos aos das FD. Semelhante ao verificado na soja, a concentração de Ni nos grãos de girassol apresentou distribuição diferente dos demais órgãos avaliados da planta. Na saturação por bases de 70% as plantas apresentaram maiores teores de Ni nos grãos em comparação as plantas cultivadas sob saturação por bases de 50%. Esses resultados ressaltam a dificuldade em estabelecer níveis críticos foliares para garantir o

fornecimento aos órgãos drenos, uma vez que a redistribuição é variável em função da saturação por bases a qual a planta foi cultivada. Destaca-se que Raij et al., (1997) recomendaram a saturação por bases de 70% para os solos agrícolas do Estado de São Paulo. O fato do N não ter sido influenciado pelo Ni pode ser justificado em parte pelo conteúdo de Ni das sementes utilizadas no experimento. A concentração de Ni das sementes de girassol utilizadas no experimento foi em média dez vezes maior que a concentração de Ni das sementes de soja que geraram plantas responsivas ao Ni em relação a concentração de N dos grãos.

Tabela 9. Concentração de N ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e Ni ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) em grãos de girassol submetidos a doses de Ni e saturações por base (V%)

		Doses de Ni				
		0,0 $\text{mg dm}^{-3}$	0,1 $\text{mg dm}^{-3}$	0,5 $\text{mg dm}^{-3}$	1,0 $\text{mg dm}^{-3}$	10,0 $\text{mg dm}^{-3}$
		----- $\text{g kg}^{-1}$ -----				
N	V50% <sup>a</sup>	20,64 ± 0,43 <sup>A</sup>	19,20 ± 2,40 <sup>A</sup>	18,94 ± 2,75 <sup>A</sup>	20,18 ± 3,54 <sup>A</sup>	20,79 ± 1,22 <sup>A</sup>
	V70% <sup>a</sup>	20,42 ± 1,23 <sup>A</sup>	20,96 ± 1,15 <sup>A</sup>	19,46 ± 2,85 <sup>A</sup>	21,31 ± 0,53 <sup>A</sup>	18,92 ± 1,61 <sup>A</sup>
		----- $\text{mg kg}^{-1}$ -----				
Ni	V50% <sup>b</sup>	0,52 ± 0,13 <sup>aC</sup>	0,60 ± 0,35 <sup>aC</sup>	0,42 ± 0,03 <sup>aC</sup>	3,10 ± 0,13 <sup>aB</sup>	7,57 ± 1,10 <sup>bA</sup>
	V70% <sup>a</sup>	0,37 ± 0,14 <sup>aC</sup>	0,63 ± 0,11 <sup>aBC</sup>	1,04 ± 0,16 <sup>aBC</sup>	2,43 ± 0,33 <sup>aB</sup>	14,12 ± 2,20 <sup>aA</sup>

N<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); Ni<sup>(\*\*)</sup>(<sup>\*\*</sup>)(<sup>\*\*</sup>). <sup>ns</sup> = não significativo. <sup>\*\*</sup> significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

## Conclusões

A utilização de níquel mesmo em doses pequenas associadas às saturações por bases de 50 e 70% influenciaram diretamente nas características agronômicas da soja e girassol, bem como no balanço dos nutrientes. A saturação por bases de 70% proporcionou plantas com melhores resultados para as características agronômicas avaliadas. Ainda sob saturação por bases de 70% as plantas que receberam 0,5  $\text{mg dm}^{-3}$  de Ni apresentaram as melhores características agronômicas com destaque para a soja que apresentou maior teor de N nos grãos. A redistribuição do Ni das folhas para os grãos é variável não só em função das doses de Ni aplicadas, mas também da saturação por bases, na qual as plantas se desenvolveram, dificultando assim o estabelecimento de níveis críticos foliares.

Estudos complementares sobre concentração de Ni em grãos de plantas cultivadas sob os principais solos agrícolas do país, bem como suas respectivas respostas a adubação com Ni podem prever a real necessidade da suplementação de Ni para as culturas comerciais.

## Referências

- ABREU, C. A.; RAIJ, B.; TANAKA, R. T. Comportamento de cultivares de soja em solo deficiente em manganês. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 19, p. 149-152, 1994.
- AHMAD, M. S. A.; ASHRAF, M.; HUSSAIN, M. Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro- and micro-nutrients in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 185, p. 1295-1303, 2011.
- AQUINO, L. A.; SILVA, F. D. B.; BERGER, P. G. Características agronômicas e o estado nutricional de cultivares de girassol irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.17, p.551-557, 2013.
- BARSUKOVA, V. S.; GAMZIKOVA, O. I. Effects of nickel surplus on the element content in wheat varieties contrasting in Ni resistance. **Agrokhimiya**, Nauka, v. 1, p. 80-85, 1999.
- BAZIHIZINA, N.; REDWANA, M.; TAITI, C.; GIORDANO, C.; MONETTI, E.; MASI, E.; AZZARELLO, E.; , MANCUSOA, S. Root based responses account for *Psidium guajava* survival at high nickel concentration. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 174, p. 137-146, 2015.
- BERTON, R. S.; PIRES, A. M. M.; ANDRADE, S. A. L.; ABREU, C. A.; AMBROSANO, E. J.; SILVEIRA, A. P. D. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.1305-1312, 2006.
- BERTRAND, D.; WOLF, A. Le nickel, oligoélément dynamique pour les végétaux supérieurs, **Comptes Rendus de L'Académie des Sciences**, Paris, v. 265, p. 1053-1055, 1967.
- BLEVINS, R. L.; THOMAS, G. W.; CORNELUIS, P. L. Influence of no-tillage and nitrogen fertilization on certain soil properties after 5 years of continuous corn. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, p.383-386, 1977.

BROWN, P. H. Nickel. In: BARKER, A.V.; PILBEAN, D. J. (Eds). **Handbook of plant nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 2007, p. 395-402.

CAIRES, E. F.; FERRARI, R. A.; MORGANO, M. A. Yield and quality of soybean as affected by surface application of lime under a non-tillage system. **Bragantia**, Campinas, v. 62, p. 283-290, 2003.

CÂMARA, G.M.S. Ecofisiologia da cultura da soja. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA E PRODUTIVIDADE DA SOJA, 1., Piracicaba, 1991. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1992. p.129-142.

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

CHARLES, I. O.; ISSAC, U. I. Effect of nickel concentrations on *amaranthus spinosus* uptake of nutrients and heavy metals in soil. **Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation**, Surabaya, v. 3, p. 87-91, 2014.

CHAUHAN, S.; TITUS, D. E.; O'BRIAN, M. R. Metals control activity and expression of the heme biosynthesis enzyme d-aminolevulinic acid dehydratase in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Madson, v. 179, p. 5516–5520, 1997.

CHEN, C.; HUANG, D.; LIU, J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. **Clean-Soil Air Water**, Hoboken, v. 37, p. 304–313, 2009.

DALTON D. A.; EVANS H. J.; HANNS 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**, Dordrecht, v. 88, p. 245–258, 1985.

DALTON, D. A.; RUSSEL, S. A.; EVANS, H. J. Nickel as a micronutrient element for plants. **BioFactors**, Oxford, v. 1, p. 11–16, 1988.

DRAOGONEKZ. K.; BASZYŃSKI, T. Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Lublin, v. 73, p. 982-986, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema Brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353 p.

EVANS, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. **Oecologia**, Berlin, v. 78, p. 9-19, 1989.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p. (Special Report, 80).

FRITSCHI, F. B.; RAY, J. D. Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll a/b ratio. **Photosynthetica**. Prague, v. 45, p. 92-98, 2007.

GAMA-RODRIGUES, A. C.; SALES, M. V. S.; SILVA, P. S. D.; COMERFORD, N. B.; CROPPER, W. P.; GAMA-RODRIGUES, E. F. An exploratory analysis of phosphorus transformations in tropical soils using structural equation modeling. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 118, p. 453-469, 2014.

GHASEMI, R.; CHAVOSHI, Z. Z.; BOYD, R. S.; RAJAKARUNA, N. A preliminary study of the role of nickel in enhancing flowering of the nickel hyperaccumulating plant *Alyssum inflatum* Nyár. (*Brassicaceae*). **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 92, p. 47-52, 2014.

HARPER, J. E. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. **Crop Science**, Madson, v. 14, p. 255–260, 1974.

HIRAKURI, M. H.; CASTRO, C.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; PROCÓPIO, S. A.; BALBINOTI JUNIOR, A. A. **Indicadores de sustentabilidade da cadeia produtiva da soja no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2014. 70 p. (Documentos, 351).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13)

IORI, V.; PIETRINI F.; CHEREMISINA, A.; SHEVYAKOVA, N. I.; RADYUKINA, N.; KUZNETSOV, V. V.; ZACCHINI, M. Growth responses, metal accumulation and phytoextraction capability in *Amaranthus* plants exposed to nickel under hydroponics. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 224, p. 1450, 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements from soil and plants**. 4 ed. New York, Taylor and Francis, 2011.

KÖRNER, L. E.; MØLLER, I. M.; JESÉN, P. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and other divalent cations on uptake of  $\text{Ni}^{2+}$  by excised barley roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 49-54, 1987.

LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. **Ecologia microbiana do solo**. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2007. 24 p.

LIN, M. H.; GRESSHOFF, P. M.; FERGUSON, B. J. Systemic regulation of soybean nodulation by acidic growth conditions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 160, p. 2028–2039, 2012.

LUI, Z. A.; YANG, J. P.; YANG, Z. C. Using a chlorophyll meter to estimate tea leaf chlorophyll and nitrogen contents. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 12, p. 339-348, 2012.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

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

MARCOS FILHO, J.; AMORIM, H.V.; SILVAROLLA, M.B.; PESCARIN, H.M.C. Relações entre germinação, vigor e permeabilidade das membranas celulares durante a maturação de

sementes de soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., Brasília, 1982. **Anais**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1982. p. 676-88.

MELO, W. J. **Variation of N-ammonia and N-oxide in a Latosol cultivated with maize (*Zea mays* L.) and lablab (*Dolichos lablab* L.)**. 1974. 146 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1974.

MISHRA, P.; DUBEY, R. S. Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 64, p. 251–261, 2011.

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**, Oxford, v. 47, p. 115–126, 2002.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F.; SEDYAMA, T. Deficiência de Mn em plantas de soja cultivadas em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, p. 199-204, 1989.

NEVES, O. S. C.; FERREIRA, E. V. D.; CARVALHO, J. G.; SOARES, C. R. F. S. Adição de níquel na solução nutritiva para o cultivo de mudas de umbuzeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 485-490, 2007.

O'HARA, G. W.; GOSS, T. J.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p.1870–1876, 1989.

O'HARA, G. W. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 41, p. 417–433, 2001.

PAIVA, H. N., CARVALHO, J. G. DE., SIQUEIRA J. O., FERNANDES A. R., MIRANDA J. R. P. Efeito da aplicação de doses crescentes de níquel sobre o teor e o conteúdo de nutrientes em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standley). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 63, p. 158-166, 2003.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. Nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. **Plant Science**, Shannon, v. 199–200, p. 79–90, 2013.

PICCINI, D. F.; MALAVOLTA, E. Effect of nickel on two common bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 15, p. 2343-2350, 1992.

RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. 285 p.

RAGSDALE, S. W. Nickel and the carbon cycle. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 101, p. 1657–1666, 2007.

RAAB, T. K.; TERRY, N. Nitrogen-source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1159–1166, 1994.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E.; BENSON, G. O. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University, 1994. 20 p. (Special Report, 53).

ROACH, W. A.; C. BARCLAY. Nickel and multiple trace deficiencies in agricultural crops. **Nature**, London, v. 157, p. 696, 1946.

SARRUGE, J. A.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: USP-ESALQ. 65 p.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: user's guide**, version 6.11. 4.ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1996. v. 2, 842 p.

SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, p. 285–308, 2006.

SREEKANTH, T. V. M.; NAGAJYOTHI, P. C.; LEE, K. D.; PRASAD, T.N.V.K.V. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. **International Journal of Environmental Science and Technology**, New York, v. 10, p. 1129–1140, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 819 p.

TIFFIN, L.O. Translocation of nickel in xylem exudates of plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 48, p. 273-277, 1971.

UREN, N. C. Forms, reaction and availability of nickel in soils. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 48p. 141-203, 1992.

URETA, A. C.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; PALACIOS, J. M. *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae symbiotic hydrogenase activity and processing are limited by the level of nickel in agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7603-7606, 2005.

VILLEGAS, E.; ORTEGA, E.; BAUER, R. **Métodos químicos usados en el CIMMYT para determinar La calidad de proteína de los cereales**. Mexico City: Centro Internacional de Mejoramiento de Mayz y Trigo, 1985.

VITTI, G. C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 37 p.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; GLENN, A. R. Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 621-624, 2003.

WEISANY, W.; RAEI, Y.; ALLAHVERDIPOOR K. H. Role of some of mineral nutrients in biological nitrogen fixation. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, New Delhi, v. 2, p. 77-84, 2013.

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

ZOBIOLE, L. H. S.; CASTRO, C; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, A.; MOREIRA, A. Curva de crescimento, estado nutricional, teor de óleo e produtividade do girassol híbrido BRS 191 cultivado no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.14, p.55-62, 2010.

## **CAPITULO IV - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL EM TECIDOS DE SOJA E GIRASSOL SUBMETIDAS A SATURAÇÕES POR BASES E DOSES DE NÍQUEL**

### **Resumo**

Embora o níquel (Ni) seja reconhecido como micronutriente, sua ação no metabolismo e na atividade de algumas enzimas vegetais ainda não são totalmente conhecidas. Objetivou-se avaliar o efeito de duas saturações por bases (V50 e V70%) e cinco doses de níquel (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 mg dm<sup>-3</sup>) nos cultivos de soja e girassol. O trabalho constou de dois experimentos realizados em vasos em esquema fatorial 2 x 5, com quatro repetições. No primeiro experimento as plantas de soja foram cultivadas até o estágio R1, ocasião em que as folhas utilizadas para diagnose e nódulos foram colhidas e utilizadas para análises. Em seguida, efetuou-se o cultivo de plantas de girassol nos mesmos vasos (tratamentos) do cultivo com soja. O girassol também foi cultivado até estágio R1, quando se retiraram folhas e raízes para análises. Avaliaram-se nas folhas as atividades da urease e da redutase do nitrato. Foram determinadas nas folhas raízes e nódulos as concentrações dos ácidos orgânicos oxálico, malônico, succínico, málico, tartárico, fumárico, oxaloacético, cítrico e láctico, por meio de cromatografia líquida. A atividade da redutase do nitrato não foi influenciada pelos tratamentos. As doses de Ni influenciaram positivamente a concentração de N nas folhas. A maior atividade da urease ocorreu nas plantas cultivadas com as maiores doses de níquel, sem efeito das saturações por base. Constatou-se interação doses de Ni x saturações por bases para as concentrações de ácidos orgânicos na soja, as quais apresentaram as maiores concentrações com a saturação por bases de V70% na dose de níquel de 0,5 mg dm<sup>-3</sup>, enquanto para o girassol as maiores produções de ácidos orgânicos foram observadas na saturação por bases de V70% e menores doses de Ni. Para as maiores doses de Ni as concentrações dos ácidos foram semelhantes nas duas saturações por base. Apenas as raízes de girassol foram ligeiramente afetadas estruturalmente nos tratamentos que receberam maior dose de Ni.

### **Introdução**

Dos elementos com essencialidade reconhecida para as plantas o níquel (Ni) foi o último a ser considerado micronutriente pelas literaturas clássicas (MARSCHNER, 1995; EPSTEIN; BLOOM, 2005; MALAVOLTA, 2006), que referenciam entre outros, os

trabalhos de Dixon et al. (1975), Eskew et al. (1983) Brown et al. (1987). Este micronutriente está envolvido na atividade da urease (EC 3.5.1.5 - enzima que hidrolisa a ureia em amônia-NH<sub>3</sub> e gás-carbônico-CO<sub>2</sub>), importante para a reassimilação do nitrogênio, via ciclo da ureia.

Os primeiros relatos da deficiência de Ni são datados de 1918, com o sintoma que ficou posteriormente conhecido como “orelha de rato”, expressão usada para descrever o estado severo da desordem apresentada pelas folhas jovens de árvores de Nogueira-pecã (*Carya illinoensis* K.) deficientes em Ni (WOOD et al., 2004a). Essa deficiência limita a ação da urease, causando manchas necróticas nas folhas em função do acúmulo de ureia. Como consequência o metabolismo de ureídeos, aminoácidos e de ácidos orgânicos é perturbado. O acúmulo de ácido oxálico e láctico é também relatado como uma resposta metabólica a deficiência de Ni (WOOD et al., 2004b; BAI et al., 2006).

Plantas deficientes em Ni acumulam nitrato como uma consequência da baixa atividade de desidrogenase de malato, visto que a atividade enzimática fornece energia para o processo de redução de nitrato (BROWN, 2006). Existem algumas evidências da relação entre assimilação de nitrato e os teores de nitrogênio (N) e Ni em plantas de café (REIS et al., 2009; 2011) e, por fim, o acúmulo de produtos do metabolismo secundário (WOOD et al., 2004b). Quanto à importância do Ni na atividade da urease em microrganismos do solo, Ureta et al. (2005) demonstraram que o baixo nível de Ni nos solos agrícolas pode limitar a atividade da hidrogenase simbiótica de *Rhizobium leguminosarum*, resultando na deficiência de N para plantas que dependem desta relação mutualística para suprimento deste nutriente.

No entanto, a literatura apresenta um número muito maior de trabalhos que apontam os efeitos tóxicos de Ni para plantas se comparados aos que apresentam deficiência. Isso porque, existe um intervalo muito estreito entre a exigência nutricional em Ni – algumas vezes relatadas como picograma ou micrograma por kg - e a concentração tóxica de Ni para as culturas. Em muitos casos as alterações ultra-estruturais a nível celular antecedem sintomas visuais provocados por desordem fisiológicas, seja pela deficiência e, ou, notadamente em condições de toxidez por elementos. Epstein; Bloom (2005) descrevem a sequência dos sintomas visuais iniciadas por alterações a níveis moleculares, seguidas de lesões subcelulares e por fim as alterações ultra-estruturais que antecedem as desordens visíveis a olho nú. Os mesmos autores destacam as técnicas de microscopia para avaliarem as desordens ultra-estruturais como ferramenta para auxiliar nos estudos de nutrição mineral de plantas.

Em níveis moleculares, a fitotoxicidade do Ni é descrita como resultado de sua ação no fotossistema, causando distúrbios no ciclo de Calvin e inibição do transporte eletrônico devido as quantidades excessivas de ATP e NADPH acumuladas pela ineficiência das reações da fase bioquímica (KRUPA et al., 1993; YUSUF et al., 2011). Outros relatos de fitotoxicidade por Ni em diferentes níveis ou não completamente descritas são: interferência na absorção de nutrientes (CROOKE; INKSON, 1978); redução na produção de sementes (PICCINI; MALAVOLTA, 1992); diminuição da concentração de clorofila observado em folhas de café (PAVAN; BUIGHAM, 1982); milho (BACCOUCH et al., 1998); e concentração de Ni em grãos de feijão a níveis inapropriados para consumo (BERTON et al., 2006).

Apesar de todos os relatos acerca da deficiência, essencialidade e toxidez de Ni, uma gama de autores afirma ainda que pouco se sabe sobre o comportamento deste elemento na nutrição mineral de plantas (BERTON et al., 2006; POLACCO et al., 2013).

No Brasil, não existem critérios de recomendação de adubações que contemplem a aplicação de Ni para as culturas, embora a comercialização de fertilizantes contendo Ni está prevista e autorizada desde 2007, pela Legislação brasileira de fertilizantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Níveis foliares de referência, críticos ou tóxicos também não são apresentados. Acredita-se que os teores naturais de Ni no solo e, ou, a utilização de outras práticas agrícolas (aplicação de fungicidas e inseticidas) supram a necessidade das culturas. Neste sentido, poucos são os trabalhos que visam avaliar “doses nutricionais” de Ni para condições tropicais com destaque para o estudo de Neves et al. (2007), os quais verificaram respostas positivas do acréscimo de Ni às plantas de umbu (*Spondias tuberosa*), cultivadas em solução nutritiva até a dose de 0,03 mmol L<sup>-1</sup>, reportando a evidência de fome oculta.

Na solução do solo o Ni se encontra predominantemente na forma Ni(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup>. Porém, nem todo Ni presente no solo está disponível às plantas. A elevação do pH do meio, a matéria orgânica (SENESI et al., 1989) e a capacidade de troca catiônica (CAMARGO et al., 1989) podem contribuir para redução das formas disponíveis de Ni no solo.

Sabendo-se que o Ni no solo apresenta disponibilidade variável em função das propriedades químico-físicas do meio e que sua concentração nas plantas interfere diretamente no desenvolvimento das mesmas, se faz necessário estabelecer critérios de avaliação que possam evidenciar o efeito do Ni na fisiologia das plantas supridas com este elemento. Para tanto, objetivou-se neste trabalho avaliar a concentração de ácidos orgânicos (oxálico, malônico, succínico, málico, tartárico, fumárico, oxaloacético, cítrico e láctico) e as

atividades da urease e redutase do nitrato em plantas de soja e girassol submetidas a dois níveis saturações por bases (V%) e cinco doses de Ni.

## **Material e métodos**

### *Descrição do experimento*

O experimento foi desenvolvido em vasos com capacidade de 10 dm<sup>3</sup>, em casa de vegetação no município de Piracicaba – SP, localizado a 22°43'12"S e 47°38'54"O, com 580 m de altitude. Para preenchimento dos vasos foram utilizadas amostras da camada de 0 – 20 cm de um Nitossolo coletado na área experimental da Agencia Paulista de Tecnologia e Agronegócios (APTA), unidade de Piracicaba – SP.

Foram utilizados 40 vasos distribuídos inteiramente ao acaso, com quatro repetições cada tratamento, utilizando esquema fatorial 2 x 5 (duas saturações por base de 50 e 70% e cinco doses de Ni: 0; 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de solo). Os vasos foram cultivados com soja e sucedidos por girassol. As doses de Ni foram estabelecidas conforme os resultados apresentados por Dalton et al. (1985), por Atta-Aly (1999); por Kevresan et al. (2001) e por Milosevic et al. (2002).

### *Desenvolvimento do experimento*

#### *Condução das culturas*

Os vasos foram preenchidos com um volume de 8,8 kg/vaso de terra equivalente a 8 dm<sup>3</sup> para uma densidade de 1,1 kg dm<sup>-3</sup>, conforme mensurações em laboratório. As características físico-químicas da terra foram: pH (CaCl<sub>2</sub>) 5; matéria orgânica 40 g dm<sup>-3</sup>; P (resina) 20 mg dm<sup>-3</sup>; K 2,9 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca 33 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg 10 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al 53 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al 1 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ni (DTPA) 0,04 mg dm<sup>-3</sup>. Simultaneamente ao preenchimento dos vasos, foi realizada a calagem individualmente, seguindo o método de saturação por bases e com dosagem necessária para atender os respectivos valores de saturação por bases. Foi utilizado calcário do tipo filler com PRNT 99% e, após sua incorporação os vasos foram irrigados de maneira que mantiveram 50% da capacidade de campo e permaneceram nesta condição até a semeadura, a qual foi procedida após 30 dias.

Utilizaram-se sementes de soja da cultivar Codetec 202 inoculada conforme método preconizado por Raij et al. (1997), utilizando-se bactérias *B. japonicum* estirpe Semia 5079. A adubação de manutenção seguiu método preconizado por Malavolta et al. (1989), com omissão de N (garantido pela inoculação) sendo aplicadas as seguintes concentrações em

ppm: P 200; K 150; Ca 75; Mg 15; S 50; B 0,5; Cu 1,5; Fe 5; Mo 0,1; Zn 5. O Ni foi aplicado por meio de solução estoque  $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$  utilizando-se sulfato de níquel hidratado ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), de acordo com cada tratamento.

Por ocasião do florescimento (estádio fenológico R1), seguindo escala fenológica de Fehr; Caviness (1977), foram coletadas as folhas recomendadas para diagnose (MALAVOLTA et al., 1997) e nódulos das raízes. Imediatamente após a retirada das plantas de soja, os vasos foram semeados com girassol (híbrido HB 29) sendo realizada apenas a adubação de manutenção (sem adição de Ni), seguindo as mesmas doses mencionadas acima, acrescida de 300 ppm de N fornecido em duas épocas: 52,3 ppm de N via nitrato de cálcio na semeadura e o restante em cobertura via ureia. No estágio R1 do girassol, seguindo escala fenológica de Schneiter; Miller (1981) foram coletadas as folhas recomendadas para diagnose e raízes secundárias.

#### *Análises laboratoriais*

Nas folhas diagnósticas de soja e girassol foram determinadas as atividades de redutase do nitrato, urease e a concentração de ácidos orgânicos: oxálico, malônico, succínico, málico, tartárico, fumárico, oxaloacético, cítrico e láctico. Estes mesmos ácidos orgânicos foram também determinados em nódulos de soja e raízes secundárias de girassol.

Para determinação da atividade da redutase do nitrato as amostras frescas (0,2 grama) de folhas diagnósticas foram incubadas por duas horas em meio de  $\text{KNO}_3$  (4 mL) em tampão fosfato. Após a incubação, 1 mL foi retirado do meio incubado e o  $\text{NO}_2^-$  presente nessa alíquota foi determinado por adição de 1 mL de ácido sulfanílico e HCl a 20% para paralisar a reação, seguindo-se a adição de 1 mL de alfa-naftilamina para desenvolver a cor rósea ao reagir com o  $\text{NO}_2^-$ . A leitura foi realizada em colorímetro equipado com filtro de 560 nm (MULDER et al., 1959).

A atividade de urease foi realizada conforme método proposto por Hogan et al. (1983) que consiste na encubação das amostras do tecido vegetal em tampão fosfato (pH 7,4) com ureia e suprimida a influencia de organismos contaminantes. Parte do extrato é encubado novamente na presença de condicionantes de amônio com posterior determinação em fotometria de absorção molecular (MCCULLOUGH, 1967).

Para determinação dos ácidos orgânicos, 0,2 grama de material vegetal (folhas diagnose, nódulos e raízes secundárias) fresco e refrigerado a  $-5^\circ \text{C}$  foi macerado com 20 mL de álcool etílico 80%, com valor de pH corrigido para 2,1 (utilizou-se de solução  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0,5 mol/L). Em seguida o extrato foi submetido a filtro de  $45 \mu\text{m}$  e refrigerado novamente.

Imediatamente antes da análise, foi coletada uma alíquota de 0,1 mL dos extratos que foi evaporada com nitrogênio e reidratada novamente voltando ao volume original. As análises dos ácidos orgânicos foram realizadas por meio de cromatografia líquida (HPLC), com sistema de dupla bomba, e detector ultra violeta com lâmpada de deutério a 210 nm e coluna de hidrogênio de troca iônica tipo AMINEX. As condições de operação consistiram de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,008 N, na fase móvel, a uma taxa de vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente (25 °C) e 66 atmosferas de pressão. Foram injetados 25 µL por amostra com tempo de corrida de 20 minutos, com mais 10 minutos para estabilização do aparelho. As misturas-padrões de calibração foram compostas pelos ácidos orgânicos em estudos, com no mínimo 5 concentrações de cada. O limite mínimo de detecção do método foi de 2 ppm para os ácidos: lático, malônico, málico, tartárico e cítrico; 1 ppm para: oxálico e succínico; 0,5 ppm para oxaloacético e; 0,1 ppm para o fumárico. A quantificação se deu por comparação dos picos em função do tempo de retenção (AUGUSTE, 1979).

Ao longo das raízes secundárias do girassol coletadas no estádio R1, foram realizadas avaliações estruturais destes tecidos. Para tanto, esses materiais foram fixados em solução de Karnovsky modificado: glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mmol L<sup>-1</sup> em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,2 por 48 horas a 4°C, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (3x 15 min.) e pós fixadas por 1 hora com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Após rápidas lavagens em solução salina 0,9%, foram coradas “em bloco” com acetato de uranila 2,5% em água overnight a 4°C. Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de acetona em água (25, 50, 75, 90 e 100%). As amostras foram incluídas em resina Epon 812 ou Spurr, segundo Luft (1961).

Os cortes ultrafinos (60-90 nm) foram depositados sobre telas de cobre recobertas com colódio, contrastados com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo conforme REYNOLDS (1963) e, em seguida, foram examinados ao microscópio eletrônico Zeiss EM-900 operando a 50kV e ampliação de 3.000 e 4.400 X.

Para os nódulos das raízes de soja realizou-se cortes longitudinais dos nódulos ainda frescos, recém coletados, dividindo estes ao meio para captação de imagem. Ainda nos nódulos, seguindo procedimento de cortes semelhantes aos praticados para estereoscopia, foi realizada leituras de cores com auxílio de um colorímetro digital. As leituras ocorreram em triplicatas para cada repetição e os resultados foram expressos pela escala L\*, a\* e b\* que consiste em três coordenadas cartesianas: luminosidade (L\*), tonalidade esverdeada-

avermelhada (a\*) e; tonalidade azulada-amarelada (b\*). Os dados obtidos serão submetidos a análise de correlação com os teores de N e/ou Ni em diferentes partes da planta.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. Nos casos em que o teste F foi significativo a 1 ou 5% de probabilidade, aplicou-se o teste de médias a 5% de probabilidade, utilizando o esquema fatorial. Quando não se verificou interação entre os fatores, realizou-se o teste de tukey para cada saturação por bases. Foram realizados testes de correlação entre os teores de N e ácidos orgânicos nas folhas. Também foram realizadas correlações entre os ácidos orgânicos e os teores de N determinados em folhas diagnose e apresentados no capítulo anterior.

## Resultados e discussão

### Atividade enzimática

Não foi observada interação entre as doses de Ni e as saturações em bases para a atividade da redutase do nitrato avaliadas nas folhas da soja (Tabela 1) e do girassol (Tabela 2). Verifica-se que os valores encontrados para atividade da enzima redutase do nitrato foram menores que aqueles relatados na literatura tanto para soja (TOLEDO et al., 2010), quanto para o girassol (JABEEN; AHMAD, 2011). Mishra; Dubey (2011), trabalhando com doses de Ni em arroz, verificaram decréscimo da atividade da enzima redutase do nitrato a medida que se elevaram as doses de Ni.

Tabela 1. Atividades da urease e da redutase do nitrato (RN) em folhas utilizadas para diagnose, de plantas de soja submetidas a duas saturações por bases e cinco doses de níquel

		Doses de Ni									
		0,0 mg dm <sup>-3</sup>		0,1 mg dm <sup>-3</sup>		0,5 mg dm <sup>-3</sup>		1,0 mg dm <sup>-3</sup>		10,0 mg dm <sup>-3</sup>	
		μmol N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>									
Urease	V50%	348,47	±96,53 <sup>ab</sup>	444,25	±24,35 <sup>aA</sup>	448,64	±36,67 <sup>aA</sup>	421,72	±20,88 <sup>aAB</sup>	454,32	±20,59 <sup>aA</sup>
	V70%	270,09	±46,68 <sup>bB</sup>	331,07	±48,44 <sup>bB</sup>	451,57	±32,47 <sup>aA</sup>	450,29	±7,61 <sup>aA</sup>	461,28	±23,74 <sup>aA</sup>
		μmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>									
RN	V50%	1,52	±1,11 <sup>A</sup>	1,2	±0,83 <sup>A</sup>	1,08	±1,11	0,29	±0,38	0,45	±0,23
	V70%	0,83	±1,05 <sup>A</sup>	1,71	±1,08 <sup>A</sup>	1,75	±0,68	1,12	±0,77	1,11	±0,35

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. urease(\*)(\*\*)(\*\*), redutase do nitrato<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); letras minúsculas: F1; maiúsculas: F2. <sup>ns</sup> = não significativo. \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade. \* significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

Os baixos valores observados para a atividade de redutase do nitrato em soja podem em parte ser justificado pela principal fonte de N disponível para a planta que é o N-orgânico oriundo da fixação biológica. Como ocorrem apenas conversões ácidas (o N-atmosférico passa para amina -  $\text{NH}_2$ ) e este é convertido em amônia/amônio ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) ainda nos nódulos), provavelmente as formas de N-nítrico na planta sejam limitadas. Weissman (1972), trabalhando com fontes de N (nitrato e amônio) para as culturas da soja e girassol, verificou atividade nula da redutase do nitrato tanto nas folhas como nas raízes, quando se utilizou apenas amônio como fonte de N. Nelson et al. (1983) reportaram que a atividade dos nódulos também pode contribuir para diminuição do nitrato na planta e por consequência diminuir a atividade da enzima. Para a baixa atividade da enzima nas folhas de girassol duas hipóteses são levantadas. A primeira se refere à ureia utilizada como principal fonte de N no experimento. Como no solo a ureia passa de amina para amônio e ambos podem ser absorvida pelas plantas (WITTE, 2011) ou oxidada a nitrato mediada por bactérias nitrificadoras (SILVA; VALE, 2000), e o processo de nitrificação do N do solo pode levar até 30 dias (CANTARELLA, 2007), a absorção de amônio pode inibir a absorção de nitrato (KRONZUCKER et al., 1999), assim como a amônia absorvida pode interferir diretamente na atividade da redutase do nitrato. Fontaine et al. (2006) verificaram que plantas de arroz apresentam preferência do uso direto da amônia via GS/GOGAT ao invés da rota GDH. A segunda hipótese seria a redução do nitrato a nitrito ocorrer em outra parte da planta. Matraszek (2008) verificou que a atividade da enzima redutase do nitrato pode variar em função da planta teste, concentração de Ni, fonte de N e também do órgão da planta analisada. O mesmo autor verificou que fornecendo amônio como única fonte de N para plantas de *Tetragonia expansa*, a atividade da enzima redutase do nitrato é muito alta nas raízes e baixa nas folhas, com valores próximos aos verificados em nosso trabalho. Mishra ; Dubey (2011) verificaram também que a variação entre a atividade de enzima redutase do nitrato pode ocorrer em função de diferentes cultivares de uma mesma espécie.

Constatou-se interação das doses de Ni e níveis de saturação por bases para a atividade da urease determinada nas folhas utilizadas para diagnose na soja, enquanto para o girassol (Tabela 2) observou-se somente efeito isolado do das doses de Ni. A atividade da urease nas plantas de soja cultivadas sob V50% foi superior aquela constatada nas plantas do tratamento controle com a dose de  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni cultivadas sob V70%, não diferindo a partir desta, enquanto as doses de Ni influenciaram positivamente a atividade da enzima nas maiores doses. Este efeito já era esperado uma vez que, as doses de Ni utilizadas no experimento não promoveram efeito de toxidez nas plantas. A diferença da atividade de urease entre o

tratamento controle e a maior dose de Ni aplicada, para o girassol foi de mais de 146%, enquanto para soja foi de 130% na V50% e de 170% na V70%. Estes resultados indicam que, devido a relação elemento/enzima, a atividade da urease constitui-se em ferramenta complementar ao monitoramento do estado nutricional em Ni nas plantas, se comparada a atividade da enzima redutase do nitrato. Deve-se enfatizar também que, a urease constitui-se de seis sub unidades, sendo que cada sub unidade contém dois átomos de Ni (DIXON et al., 1975).

Tabela 2. Atividades da urease e da redutase do nitrato (RN) e em folhas utilizadas para diagnose de plantas de girassol submetidas a duas saturações por bases e cinco doses de níquel

		Doses de Ni									
		0,0 mg dm <sup>-3</sup>		0,1 mg dm <sup>-3</sup>		0,5 mg dm <sup>-3</sup>		1,0 mg dm <sup>-3</sup>		10,0 mg dm <sup>-3</sup>	
		μmol N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>									
Urease	V50%	322,65	±117,28 <sup>A</sup>	244,08	±82,87 <sup>A</sup>	315,69	±29,03 <sup>A</sup>	388,02	±39,34 <sup>A</sup>	370,99	±26,82 <sup>A</sup>
	V70%	167,35	±14,37 <sup>B</sup>	279,61	±75,17 <sup>AB</sup>	298,11	±92,28 <sup>AB</sup>	349,38	±78,24 <sup>A</sup>	347,00	±5,92 <sup>A</sup>
		μmol NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>									
RN	V50%	0,35	±0,37 <sup>A</sup>	1,33	±1,14 <sup>A</sup>	0,44	±0,78 <sup>A</sup>	1,76	±1,03 <sup>A</sup>	1,08	±1,07 <sup>A</sup>
	V70%	1,31	±0,57 <sup>A</sup>	1,20	±0,91 <sup>A</sup>	1,21	±0,91 <sup>A</sup>	1,13	±1,04 <sup>A</sup>	0,99	±0,42 <sup>A</sup>

(F1: V%) (F2: doses de Ni) (Interação F1 x F2). F = Fator. urease<sup>(ns)</sup>(<sup>\*\*</sup>)(<sup>ns</sup>), redutase do nitrato<sup>(ns)</sup>(<sup>ns</sup>)(<sup>ns</sup>); letras minúsculas: F1; maiúsculas: F2. <sup>ns</sup> = não significativo. <sup>\*\*</sup> significativo ao nível de 1% de probabilidade. <sup>\*</sup> significativo ao nível de 5% de probabilidade. Minúscula: coluna. Maiúscula: linha.

A maior atividade da urease verificada na soja cultivada com V50% em comparação as cultivadas com V70%, nas menores doses de Ni aplicado se deu em função do pH, uma vez que, este é fator determinante para a disponibilidade do Ni, de modo que, pode-se inferir que na V70% houve maior adsorção de Ni ao solo o que restringiu a disponibilidade às plantas. No caso do girassol, a saturação por bases não influenciou na atividade da urease, porém as menores doses de Ni também apresentaram plantas com menor atividade da enzima. Neste sentido, a própria exportação de Ni pela soja pode justificar essa limitação, já que não foram aplicadas outras doses deste elemento após a colheita da soja.

### Ácidos orgânicos

Devido à diferença de concentrações dos ácidos orgânicos entre as partes das plantas, foi necessária a utilização de duas unidades de grandeza para apresentação dos resultados, de modo que nas folhas os ácidos orgânicos foram expressos em g kg<sup>-1</sup>, devido a grande concentração e, para raízes e nódulos utilizou-se mg kg<sup>-1</sup>. A maior concentração de ácidos

orgânicos nas folhas em comparação as raízes também foi verificadas por Yang et al. (1997) que estudaram o efeito do Ni na concentração de ácidos orgânicos em raízes e folhas de gramíneas. Os autores atribuíram a este efeito a alta mobilidade do Ni no xilema.

Nas folhas de soja (Figura 1) e girassol (Figura 3), dos nove ácidos orgânicos avaliados apenas o ácido malônico foi influenciado pela interação dos fatores (saturações por bases e doses de Ni) nas duas culturas avaliadas. A concentração do ácido fumárico ficou abaixo do limite mínimo de detecção do método ( $< 0,001 \text{ g kg}^{-1}$ ), tanto para soja, quanto para girassol, o que inviabilizou a sua determinação. O mesmo ocorreu para o ácido tartárico ( $< 0,002 \text{ g kg}^{-1}$ ) e oxaloacético ( $< 0,005 \text{ g kg}^{-1}$ ) na soja e para o cítrico ( $< 0,001 \text{ g kg}^{-1}$ ) no girassol. Verifica-se que os ácidos málico e oxálico na soja e lático, succínico e tartárico no girassol não foram influenciados pelo efeito da interação saturações por bases  $\times$  doses de Ni.

Os conteúdos de ácidos cítrico, lático e malônico apresentaram comportamento semelhante nas folhas diagnósticas de soja, os quais, por sua vez, não foram influenciados pelas doses de níquel na V50% e apresentaram maior concentração na dose de  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni na V70%. A exceção do ácido oxálico e succínico, na soja, em geral sob V70% foram verificadas as maiores concentrações dos ácidos orgânicos. Nenhum dos ácidos avaliados apresentou maior concentração no tratamento controle, estes, sempre ficaram abaixo ou não diferiram dos demais.

O único ácido orgânico determinado em todos os tratamentos para nódulos de soja (Figura 2) e raízes secundárias girassol (Figura 4) foi o ácido succínico. O ácido fumárico também foi determinado em todos os tratamentos, mas somente em raízes de girassol enquanto o ácido malônico foi determinado nos nódulos de soja apenas na saturação por bases de 50%. Os demais ácidos avaliados ficaram abaixo do limite de determinação (oxálico  $< 1,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ; cítrico  $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ; oxaloacético  $5,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ; málico  $2,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ; malônico  $2,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ; lático  $2,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ; tartárico  $2,00 \text{ mg kg}^{-1}$ ; fumárico  $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou foram determinados isoladamente em alguns tratamentos, sendo passíveis apenas de estatística descritiva. Nos nódulos de soja o ácido oxaloacético foi determinado nos tratamentos V50% com a dose de  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni ( $25,59 \pm 12,79 \text{ mg kg}^{-1}$ ); e  $10,0 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $41,01 \pm 15,93 \text{ mg kg}^{-1}$ ); também foi determinado o ácido lático na V70% na dose  $0,0$ -controle  $\text{mg dm}^{-3}$  de Ni ( $275,65 \pm 105,96 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Nas raízes de girassol foram determinados os ácidos oxálico: em V50% nas doses  $0,0$ -controle  $\text{mg dm}^{-3}$  de Ni ( $1,28 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ );  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni ( $1,31 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ ); e  $10,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni ( $1,20 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e; V70% nas doses  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni ( $0,07 \pm 0,00 \text{ mg kg}^{-1}$ );  $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni ( $0,09 \pm 0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ );  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni ( $0,07 \pm 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e;  $10,0 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni ( $0,07 \pm 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ); ácido cítrico em

V50% nas doses 0.0-controle mg dm<sup>-3</sup> de Ni ( $25,87 \pm 7,21$  mg kg<sup>-1</sup>); 0.1 mg dm<sup>-3</sup> de Ni ( $21,26 \pm 1,97$  mg kg<sup>-1</sup>) e; V70% na dose de 10.0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni ( $17,18 \pm 10,18$  mg kg<sup>-1</sup>) e; ácido láctico em V50% nas doses 0.0-controle mg dm<sup>-3</sup> de Ni ( $797,62 \pm 94,93$  mg kg<sup>-1</sup>) e 0.1 mg dm<sup>-3</sup> de Ni ( $471,82 \pm 9,65$  mg kg<sup>-1</sup>).

O comportamento dos ácidos orgânicos diferem dos indicativos de fitotoxicidade verificados na literatura, em que existem relatos de aumento constante de determinados ácidos, com destaque para o málico e oxálico (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000), em função das doses de Ni aplicadas. Dos ácidos que sofreram influência da interação saturação por bases  $\times$  doses de Ni, os ácidos cítrico, malônico e succínico na V70% apresentaram maiores valores de produção nas doses intermediárias de Ni. Neste sentido, consideraram-se os picos destes ácidos como a condição ideal das plantas para este estudo. Essa conclusão baseia-se no trabalho de Bay et al. (2006) realizado com plantas de pecan com dois níveis de Ni (deficiente e suficiente), em que avaliaram-se seis dos nove ácidos orgânicos presentes neste estudo, e verificaram menor concentração dos ácidos orgânicos, a exceção do oxálico e láctico, em condição de Ni deficiente. Assim, podemos inferir que a maior produção de ácido oxálico na V50% é um indicativo de stress do qual as plantas de soja são submetidas sob estas condições, muito embora, Souza; Lobato (2004) recomendaram este nível de saturação por bases para o cultivo da soja. Diferente de Rajj et al. (1997) que recomendaram uma saturação por bases de 60%.

O resultado mais contrastante deste trabalho é em relação ao ácido láctico encontrado também nas plantas que receberam doses intermediárias de Ni, consideradas aqui como condição ideal para soja. Num primeiro momento, com base na literatura, o ácido láctico em grandes concentrações é uma resposta ao desdobramento da glicose sob condições anaeróbias (WALKER et al., 1985), porém, esta é uma resposta metabólica a baixa atividade da enzima urease, que seria consequência da deficiência de Ni. O ácido láctico foi reportado por Bai et al. (2006) como uma resposta ao desdobramento da glicose sob condições anaeróbias e que potencialmente pode ocorrer como resposta indireta a deficiência de Ni. Estas hipóteses não fundamentam os resultados obtidos visto que, o tratamento que verificou maior concentração de ácido láctico foi o tratamento que proporcionou as melhores características (atividade de urease, concentração de N e ácidos orgânicos) as plantas testadas.

É sugerido que para as maiores concentrações de ácido láctico no tratamento considerado ideal seja resultado de uma estratégia da planta para obter energia a partir de um ciclo metabólico mais curto e rápido, pela via anaeróbia a partir da quebra da glicose. Essa hipótese é sustentada pelo estágio de desenvolvimento das plantas em que foram coletados os

tecidos vegetais amostrados. Por se tratarem de plantas com hábito de crescimento determinado, no início do florescimento (período em que os tecidos vegetais foram coletados) há grande exigência de energia em curto espaço de tempo para produção das estruturas reprodutivas (flores e frutos). A evidência da influência do Ni no período de florescimento das culturas foi reportado por Malavolta et al. (2006) que verificaram que metade do Ni acumulado nas folhas, ramos e flores de plantas de laranjeira foi encontrado nas flores. Adicionalmente, o ácido láctico tem sido relatado como promotor do crescimento de plantas e cultura de tecidos (KINNERSLEY et al., 1990; YOSHIKAWA et al., 1993).

As menores concentrações de ácidos orgânicos nos nódulos de soja podem indicar ambiente favorável à planta uma vez que, estes ácidos são determinados em raízes de plantas quando há necessidade de uma adaptação, em que são considerados ambientes desfavoráveis dentre outros, os que apresentam metais pesados em concentrações tóxicas (LOPEZ-BUCIO et al., 2000; HAN et al., 2005; CHAFFAI et al., 2006). Neste estudo os ácidos orgânicos determinados apresentaram maiores concentrações nas plantas cultivadas sob o tratamento controle.

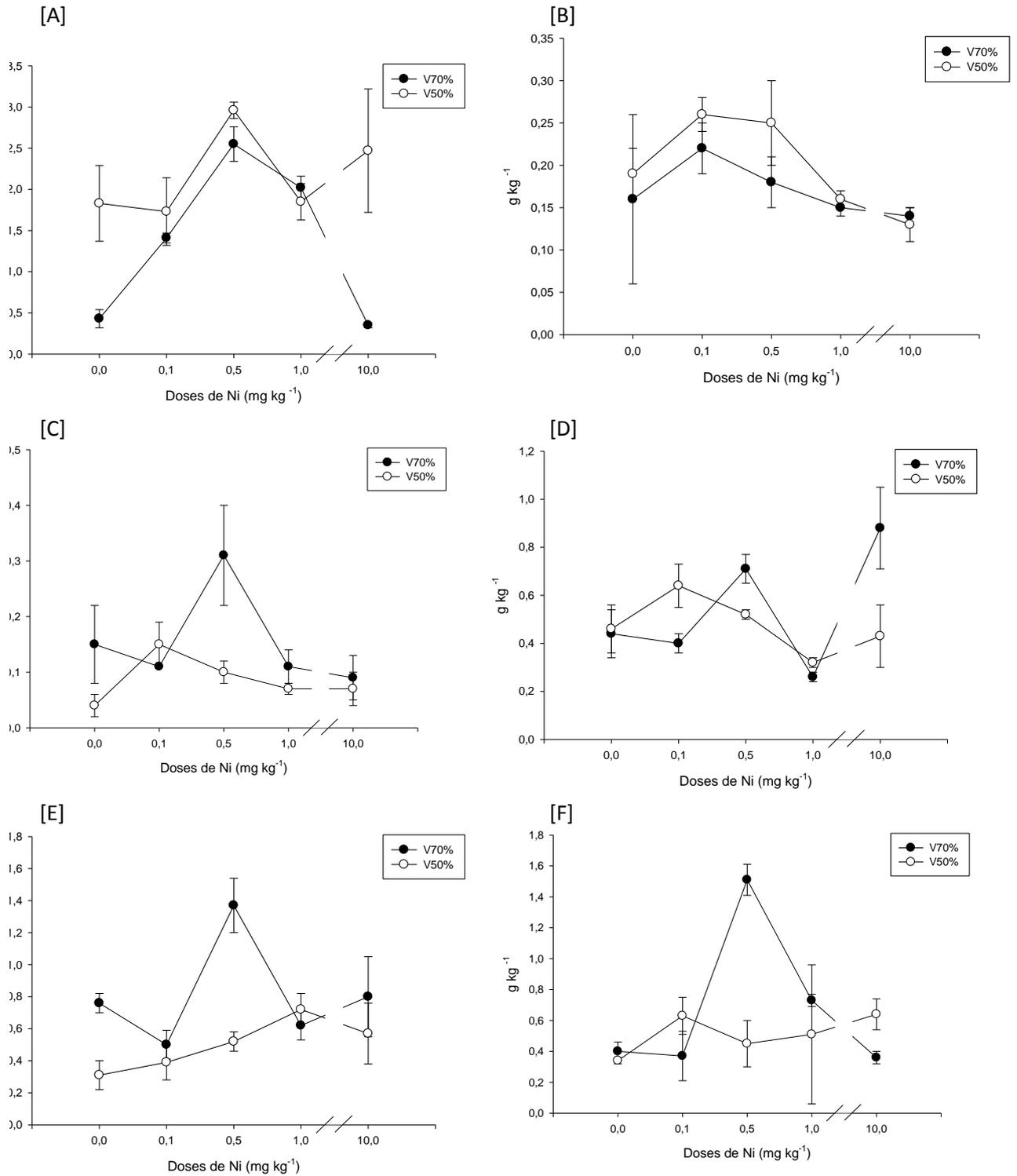


Figura 1. Concentração de ácido succínico [A], ácido oxálico [B], ácido cítrico [C], ácido málico [D], ácido malônico [E] e ácido láctico [F] em folhas de soja submetidas a duas saturações por bases e cinco doses de níquel

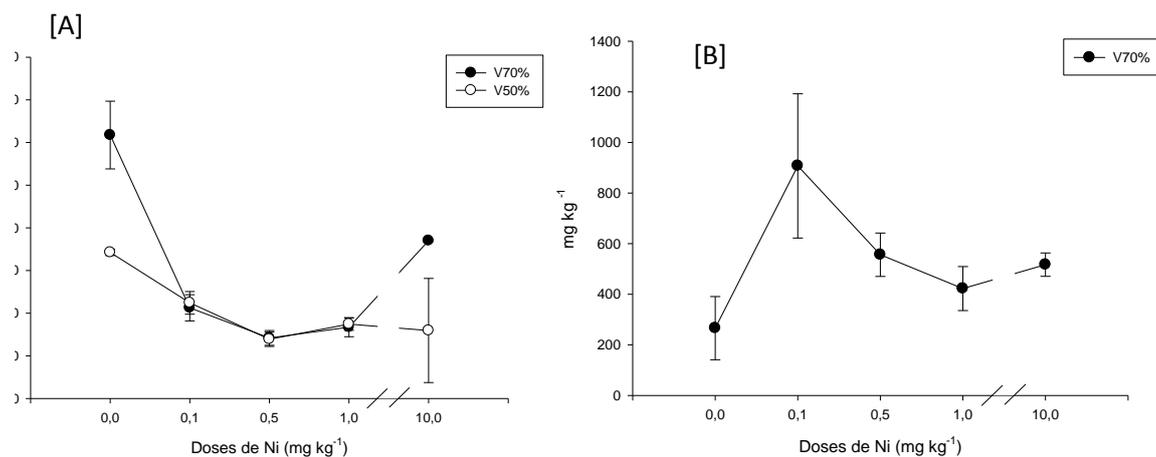


Figura 3. Concentração de ácido succínico [A] e ácido malônico [B] em nódulos de soja submetidas a duas saturações por bases e cinco doses de níquel

### *Girassol*

De modo contrário ao observado na soja, as maiores concentrações de ácido málico foram observados para o tratamento com valores na V70%. Também o ácido oxálico apresentou distribuição estatística semelhante. Em geral, o comportamento dos ácidos orgânicos determinados nas folhas de girassol não apresentou linearidades sobre a influência do Ni para esta cultura. Num primeiro momento, as maiores concentrações dos ácidos málico, malônico e oxáloacético verificadas nas menores doses de Ni na V70% poderiam ser indicativos de deficiência de Ni, pois esse elemento tem sua disponibilidade reduzida em função da elevação do pH, porém, nas maiores doses de Ni (1,0 e 10 mg dm<sup>-3</sup>), ocorre em geral, uma diminuição da produção dos ácidos orgânicos na V70% e uma elevação na V50%, não caracterizando, portanto, uma toxidez pelo aumento das doses na V50%. Ao passo que pode-se inferir apenas que existe um equilíbrio da produção de ácidos orgânicos nas doses mais altas de Ni, nas duas saturações por bases avaliadas, seja para conferir o transporte do Ni dos locais de absorção para os locais de consumo, ou como mecanismo para reduzir a toxidez/excesso de Ni absorvido pelas plantas.

Também se observou para as plantas de girassol que o ácido láctico é produzido em maior quantidade na V70%. Desse modo, a mesma teoria observada para a soja (a respeito da rota metabólica mais curta para obtenção de energia) pode justificar esse efeito no girassol com a diferença que nesta segunda cultura a fonte de N foi a ureia fornecida via adubo mineral.

Quanto à concentração dos ácidos orgânicos nas raízes, para o ácido succínico verifica-se grande discrepância entre os valores determinados nas saturações de V50% e

V70%, na qual a partir da dose de  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  de Ni até a dose máxima de Ni aplicada as raízes desenvolvidas sob saturação de 50% apresentaram mais que o dobro de ácido succínico em comparação as plantas cultivadas sob V70% podendo considerar um indicativo de adaptação ao ambiente desfavorável, uma vez que, a recomendação de saturação por bases pra esta cultura é de 70% (RAIJ et al., 1997). Também foram verificadas concentrações de ácidos lácticos e cítrico e oxálico nas raízes de plantas cultivadas com saturação de bases de 50%, enquanto o mesmo não ocorreu para as plantas cultivadas em solo com saturação de bases de 70%.

Salienta-se ainda que, estudos específicos devem ser realizados a fim de elucidar o comportamento dos ácidos orgânicos em função do Ni, numa gama maior de culturas no intuito de localizar estes ácidos orgânicos nas ultraestruturas celulares (*e.g.*, maior concentração em vacúolos, permitindo maior acúmulo de Ni nestas organelas, como observado para diversas espécies hiperacumuladoras). Estes estudos devem identificar ácidos orgânicos que melhor representem a correlação com o estado nutricional das culturas bem como, identificar e quantificar mecanismos indicativos de tolerância e toxidez.

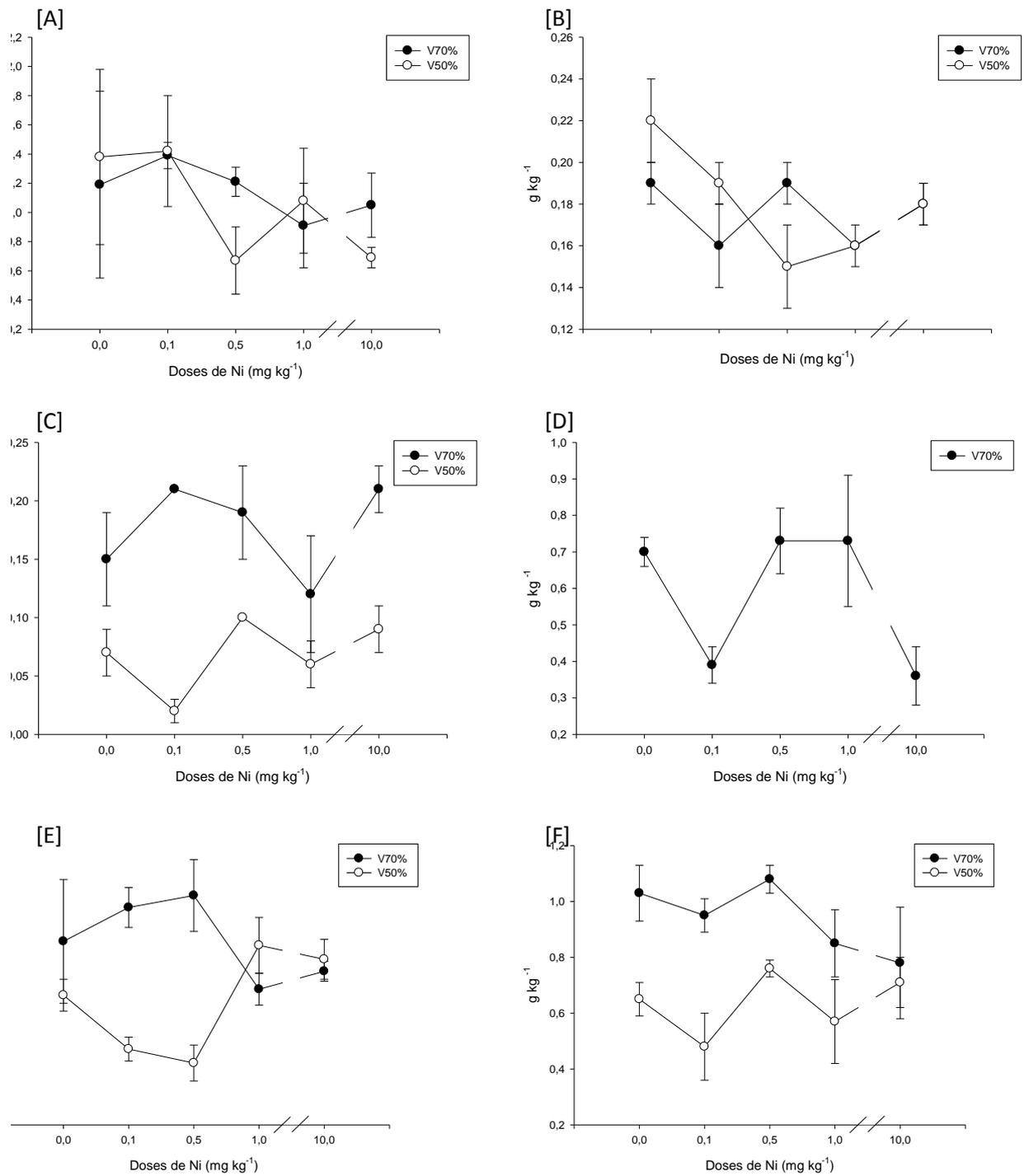


Figura 3. Concentração de ácido succínico [A], ácido oxálico [B], ácido oxaloacético [C], ácido málico [D], ácido malônico [E] e ácido lático [F] em folhas de girassol submetidas a duas saturações por bases e cinco doses de níquel

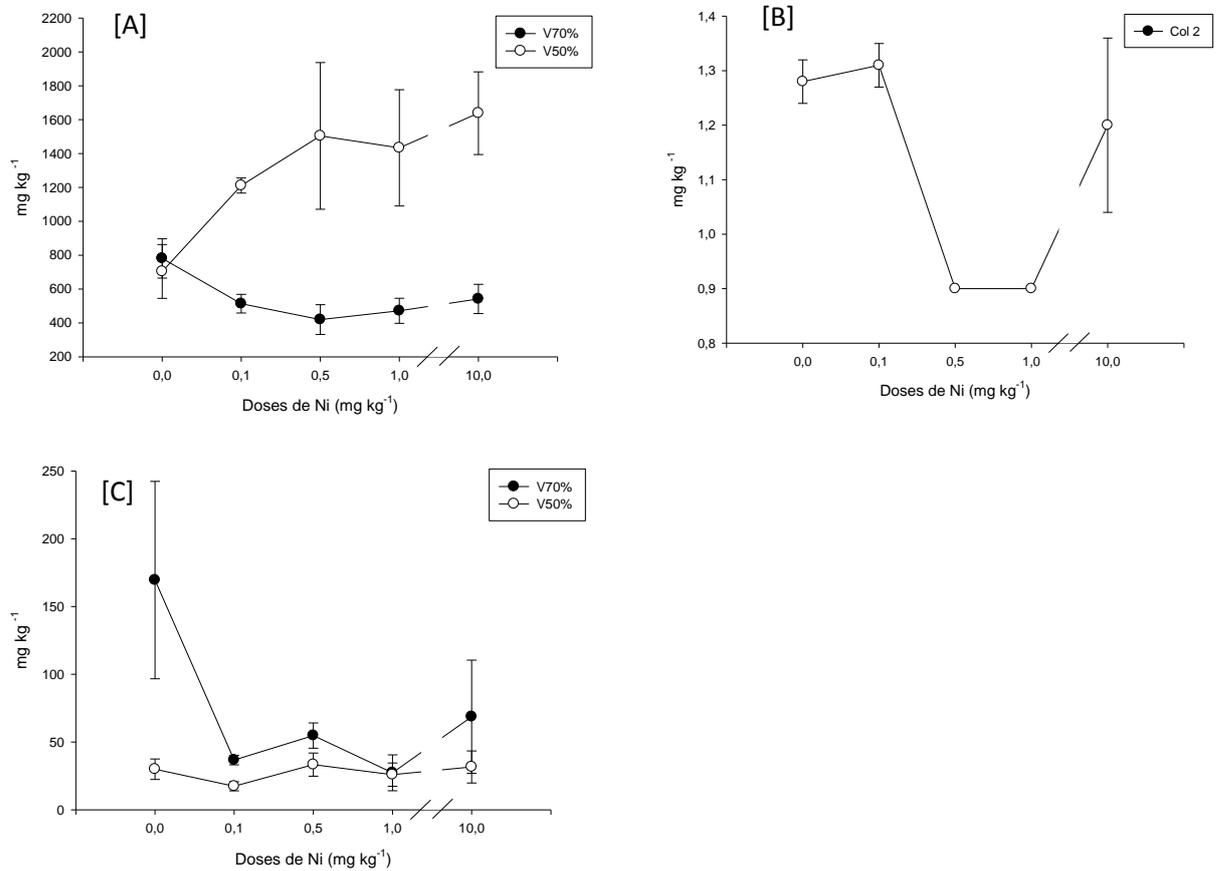


Figura 4. Concentração de ácido succínico [A], ácido oxálico [B] e ácido fumárico [C] em raízes de grissol submetidas a duas saturações por bases e cinco doses de níquel

### Fotometria

As leituras realizadas com colorímetro não apresentaram correlações entre as cores dos nódulos e a concentração de N nos grãos de soja (Tabela 3). As FD embora tenham se correlacionados com as tonalidade esverdeada-avermelhada (A) e azulada-amarelada (B) apresentaram baixo coeficiente de correlação necessitando melhor calibração do aparelho para esta finalidade. Destaca-se que o colorímetro é destinado a avaliação de frutos.

Tabela 3. Correlações entre cores de nódulos e concentração de N em folhas diagnósticas (FD) e grãos de soja

	Colorímetro		
	L	A	B
FD	-0,1362 <sup>ns</sup>	0,3978*	0,3146*
Grão	0,2554 <sup>ns</sup>	0,1806 <sup>ns</sup>	0,0175 <sup>ns</sup>

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade. <sup>ns</sup>: não significativo

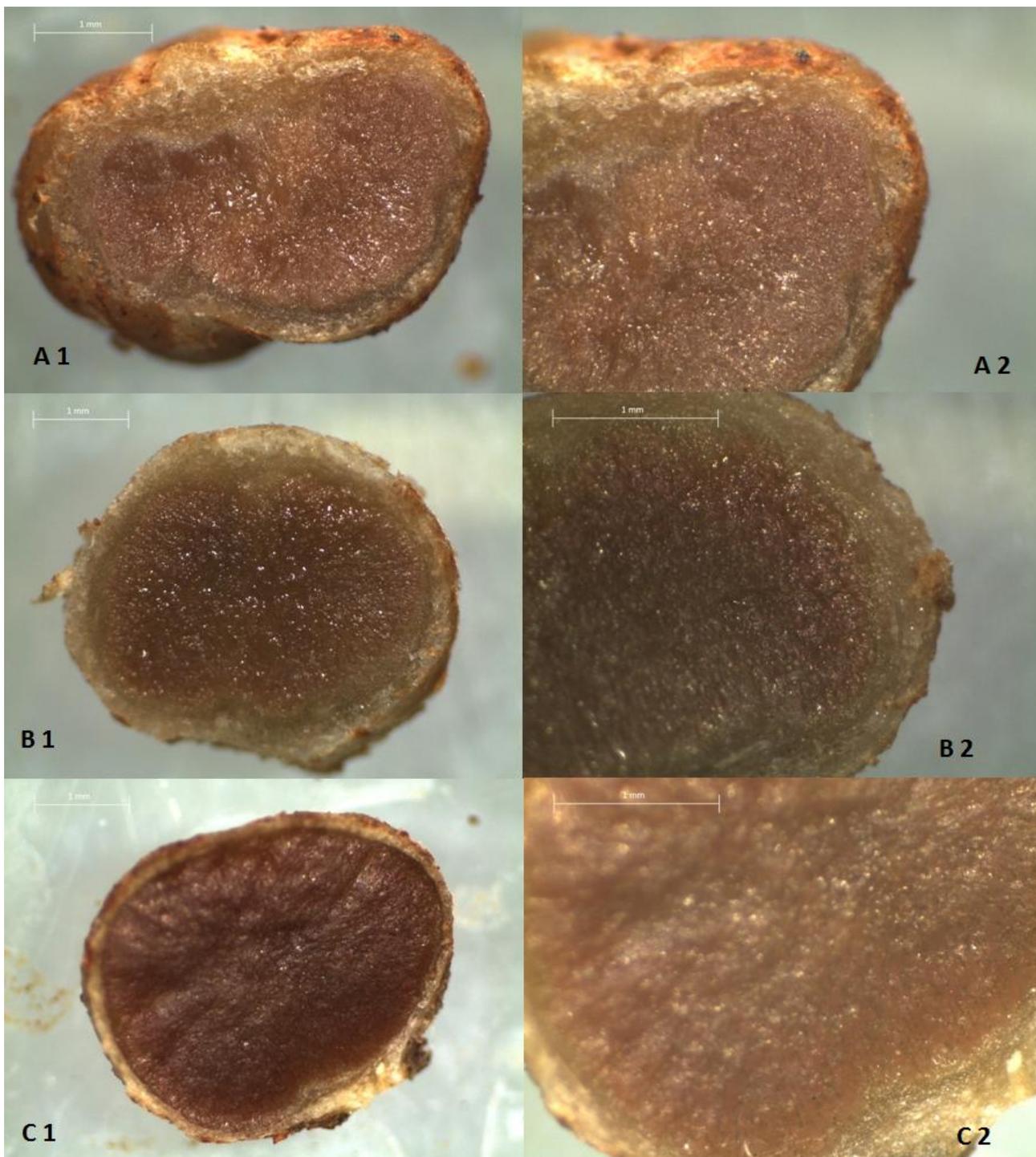


Figura 5. A-1 Secção longitudinal A-2 Corte aproximado de nódulo de soja cultivado em vasos com amostras de Nitossolo com saturação por bases de 50% e  $0,0 \text{ g dm}^{-3}$  de Ni. B-1 Secção longitudinal. B-2 Corte aproximado de nódulo de soja cultivado em vasos com amostras de Nitossolo com saturação por bases de 50% e  $0,5 \text{ g dm}^{-3}$  de Ni. C-1 Secção longitudinal. C-2 Corte aproximado de nódulo de soja cultivado em vasos com amostras de Nitossolo com saturação por bases de 50% e  $10,0 \text{ g dm}^{-3}$  de Ni. Barras: 1 mm.

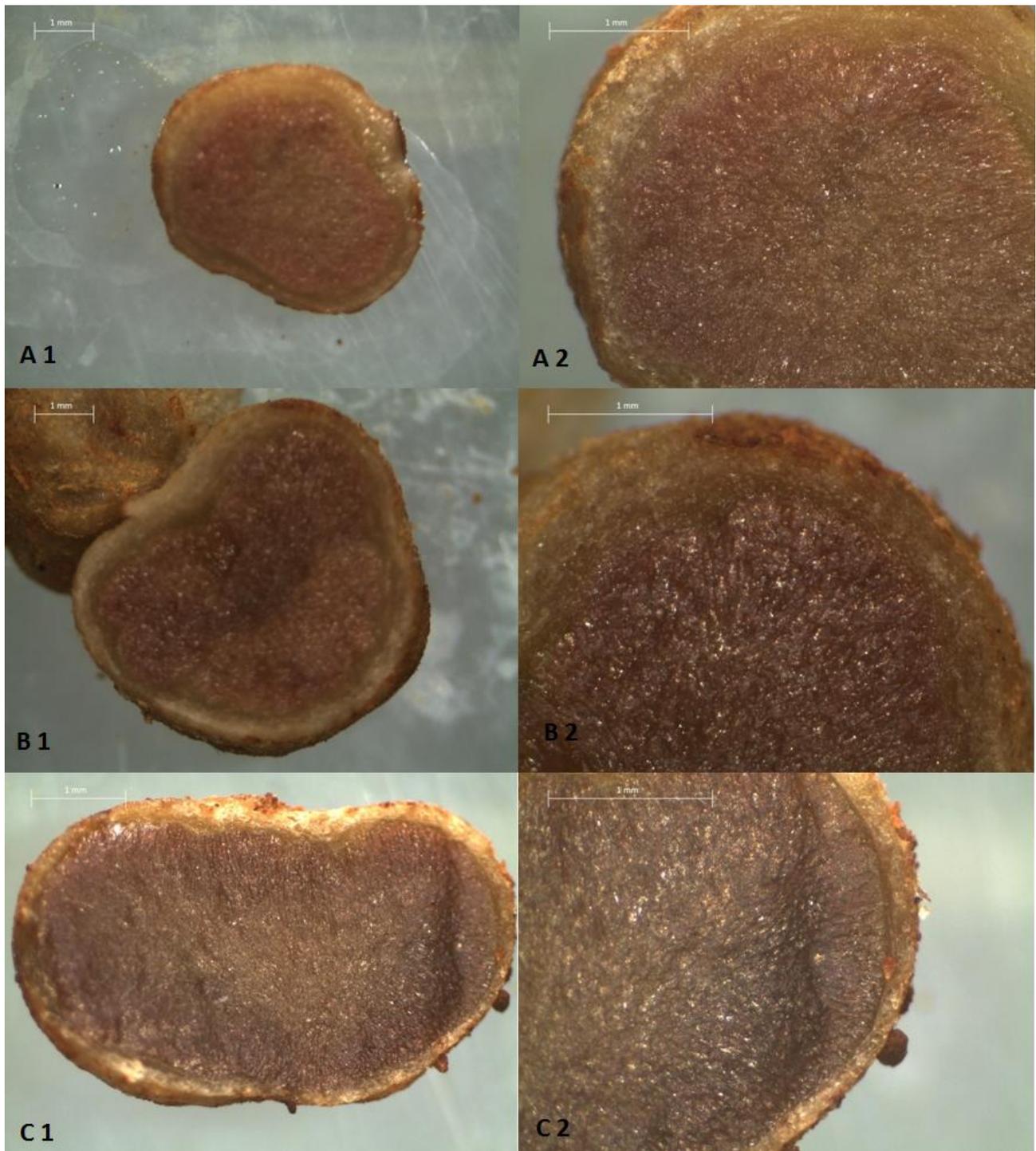


Figura 6. A-1 Secção longitudinal A-2 Corte aproximado de nódulo de soja cultivado em vaso com amostra de Nitossolo com saturação por bases de 70% e  $0,0 \text{ g dm}^{-3}$  de Ni. B-1 Secção longitudinal B-2 Corte aproximado de nódulo de soja cultivado em vasos com amostras de Nitossolo com saturação por bases de 70% e  $0,5 \text{ g dm}^{-3}$  de Ni. C-1 Secção longitudinal. C-2 Corte aproximado de nódulo de soja cultivado em vasos com amostras de Nitossolo com saturação por bases de 70% e  $10,0 \text{ g dm}^{-3}$  de Ni. Barras: 1 mm.

Para as imagens das raízes de girassol (Figura 6) foi realizada análise comparativa entre os tratamentos de maior e menor dose de Ni sob as duas saturações por bases avaliadas. Observou-se por meio das secções transversais pequena redução no número de camadas de células corticais nas raízes de plantas cultivadas sob saturação por bases de 50% com a dose 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni.

Nas secções longitudinais nas doses de 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni em ambas saturações por bases avaliadas foi possível observar o desenvolvimento de primórdios de raízes laterais a partir de células do cilindro vascular, o mesmo não foi observado nas raízes controle. Como grande parte do Ni absorvido se concentra nas raízes e, mais precisamente no cilindro vascular é possível que a emissão de novas raízes secundárias (mesmo que em pequenas quantidades) possa ter sido induzidas pelo Ni uma vez que, esse elemento pode alterar a atividade mitótica das células (CHEN et al., 2009).

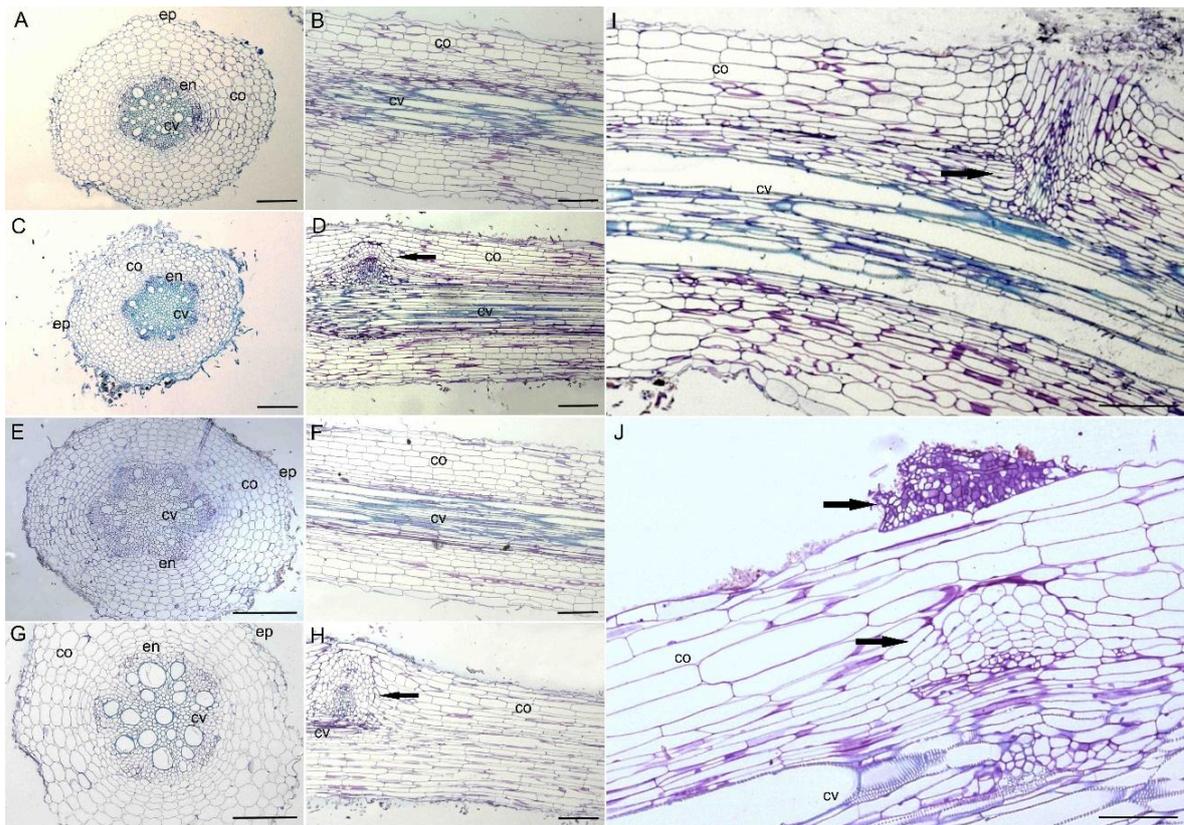


Figura 7. Efeito do níquel (Ni) em raízes de girassol (*Helianthus annuus*) utilizando duas saturações (50% e 70%) e dose de 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni no solo. A,C,E,G) secções transversais. B,D,F,H,I,J) secções longitudinais. A,B) Saturação de 70% e 0,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni; C,D,I) Saturação de 70% e 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni; E,F) Saturação de 50% e 0,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni; G,H,J) Saturação de 50% e 10,0 mg dm<sup>-3</sup> de Ni. cv: cilindro vascular; en: endoderme; ep: epiderme; co: córtex. Setas indicam intensa proliferação celular a partir da região do xilema e

metafloema para formação de prováveis de primórdios de raízes laterais. Barras: A-D,F,H,I,J= 250  $\mu\text{m}$ ; E,G= 200  $\mu\text{m}$ .

### Conclusões

A atividade da redutase do nitrato não foi influenciada pelos tratamentos. A atividade da urease nas folhas foi sempre responsiva a aplicação de níquel indiferente das saturações por base. Os ácidos orgânicos que foram fortemente influenciados pela interação doses de níquel  $\times$  saturações por bases e apresentaram relações com o estado nutricional das culturas – com destaque para o N, cujo os dados foram apresentados no capítulo anterior – as maiores produções de ácidos orgânicos se deu no tratamento V70% com a dose de 0,5 mg dm<sup>-3</sup> de Ni. Apenas as raízes de girassol foram ligeiramente afetadas estruturalmente nos tratamentos que receberam maior dose de Ni.

### Referências

ATTA-ALY, M. A. Effect of nickel addition on the yield and quality of parsley leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, p. 9-24, 1999.

AUGUSTE, M. H. **Application de la chromatographie en phase liquide à haute pression à l'analyse des moûts et des vins**. 1979. 135 f. Thèse (PhD) - Université de Bordeaux II, Bordeaux, 1979.

BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity: effects on growth and metabolism of maize. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, p. 577-588, 1998.

BAI, C.; REILLY, C. C.; WOOD, B. W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 433-443, 2006.

BERTON, R. S.; PIRES, A. M. M.; ANDRADE, S. A. L.; ABREU, C. A.; AMBROSANO, E. J.; SILVEIRA, A. P. D. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1305-1312, 2006.

BROWN, P. H. Nickel. In: BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. **Handbook of plant nutrition**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 395-409.

BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel A micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 801-803, 1987.

CAMARGO, O. A.; ROVERS, H.; VALADARES, J. M. A. S. Adsorção de níquel em Latossolos paulistas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, p. 125-129, 1989.

CANTARELLA, H. **Nitrogênio**. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. Fertilidade do solo. 2. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CHAFFAI, R.; TEKITEK, A.; EL FERJANI, E. A comparative study on the organic acid content and exudation in maize (*Zea mays* L.) seedlings under conditions of copper and cadmium stress. **Asian Journal of Plant Science**, Bholakpur, v. 5, p. 598–606, 2006.

CROOKE, W. M.; INKSON, R. H. E. Relation between nickel toxicity and major nutrient supply. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 49, p. 395, 1978.

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**, Dordrecht, v. 88, p. 245-258, 1985.

DIXON, N. E.; BLAKELEY R. L.; ZERNER. R. Jack-Bean urease (EC 3.5.1.5.3.). III. The involvement of active site Ni ion in inhibition by b-mercaptoethanol and phosphoramidate, and fluoride. **Canadian Journal of Biochemistry** v. 58, p. 481-488, 1980.

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**, Washington, v. 97, p. 4131-4133, 1975.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2 ed. Sunderland: Sinauer, 2005. 400 p.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel and essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. **Science**, Washington, v. 222, p. 691-693, 1983.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p. (Special Report, 80).

FONTAINE, J. X.; SALADINO, F.; AGRIMONTI, C.; BEDU, M.; TERCE-LAFORGUE, T.; TETU, T.; HIREL, B.; RESTIVO, F. M.; DUBOIS, F. Control of the synthesis and subcellular targeting of the two GDH genes products in leaves and stems of *Nicotiana glauca* and *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, p. 410–418, 2006.

HAN, F.; SHAN, X. Q.; ZHANG, J.; XIE, Y. N.; PEI, Z. G.; ZHANG, S. Z.; ZHU, Y. G. WEN, B. Organic acids promote the uptake of lanthanum by barley roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 165, p. 481–492, 2005.

HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E.; DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissue. **Phytochemistry**, Oxford, v. 22, p. 663-665, 1983.

JABBEN, N.; AHMAD, R. Foliar application of potassium nitrate affects the growth and nitrate reductase activity in sunflower and safflower leaves under salinity. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Napoca, v. 39, p. 172-178, 2011.

KEVRESAN, S.; PETROVIC, N.; POPOVIC, M.; KANDRAC, J. Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead, and molybdenum. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 24, p. 1633-1644, 2001.

KINNERSLEY, A. M.; SCOTT III, T. C.; YOPP, J. H.; WHITTEN, G. H. Promotion of plant growth by polymers of lactic acid. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 9, p. 137–146, 1990.

KRONZUCKER, H. J.; GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, Y. Inhibition of Nitrate uptake by Ammonium in Barley. Analysis of component fluxes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 283–291, 1999.

KRUPA, Z.; SIEDLECKA, A.; MAKSYMIEC, W.; BASZYNSKI, Y.T. 1993. In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 142, p. 664-668, 1993.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; CAKMAK, I. Effects of seed nickel reserves or externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea- or nitrate-fed soybean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 376, p. 261–276, 2014.

LÓPEZ-BUCIO, L.; NETO-JACOBO, M. F.; RAMIREZ-RODRIGUES, V.; HERRARA-ESTELLA, L. Organic acids metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, Shannon, v. 160, p. 1-13, 2000.

LUFT, J. H. Improvements in an epoxy resin embedding methods. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, Baltimore, v. 9, p. 409-14, 1961.

MALAVOLTA, E. 2006. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Sao Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MALAVOLTA, E.; LEÃO, H.C.; OLIVEIRA, S.C.; LAVRES JUNIOR. J.; MORAES, M.F.; CABRAL, C.P.; MALAVOLTA, M. Repartição de nutrientes nas flores, folhas e ramos da laranjeira cultivar Natal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, p.506-511, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1989. 201 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**, 2. ed. London, Kluwer Academic, 1995. 889 p.

MATRASZEK, R. Nitrate reductase activity of two leafy vegetables as affected by nickel and different nitrogen forms. **Acta Physiologia Plantarum**, Heidelberg, v. 30, p. 361-370, 2008.

MELO, W.J. **Variação do N-amoniaco e N-nítrico em um Latossolo roxo cultivado com milho (*Zea mays* L.) e com lablab (*Dolichos lablab* L.)**. 1974. 104 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1974.

McCULLOUGH, H. Determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, p. 297-304, 1967.

MILOSEVIC, N.; GOVEDARICA, M.; KASTORI, R.; PETROVIC, N. Effect of nickel on wheat plants, soil microorganisms and enzymes. **Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia**, Bolyai, v. 47, p. 79-84, 2002.

MISHRA, P.; DUBEY, R. S. Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 64, p. 251–261, 2011.

MULDER, E. G.; BOXMA, R.; VENN, W. L. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissue. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 10, p. 335-355, 1959.

NELSON, R. S.; RYAN, S. A.; HARPER, J. E. Soybean mutants lacking constitutive nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, p. 503-509, 1972.

NEVES, O. S. C.; FERREIRA, E. V. D.; CARVALHO, J. G.; SOARES, C. R. F. S. Adição de níquel na solução nutritiva para o cultivo de mudas de umbuzeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 485-490, 2007.

PAVAN, M. A.; BINGHAM, F. T. Toxidez de metais pesados em plantas. II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 323-328, 1982.

PICCINI, D. F.; MALAVOLTA, E. Effect of nickel on two common bean cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 15, p. 2343-2350, 1992.

POLACCO, J. C.; MAZZAFERA, P.; TEZOTTO, T. 2013. Nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. **Plant Science**, Shannon, v. 199-200, p. 79-90, 2013.

RAIJ, B. ; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. 1997. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 285 p.

REIS, A. R.; FAVARIN, J. L.; GALLO, L. A.; MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F.; LAVRES JR., J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Viçosa, v. 33, p. 315-324, 2009.

REIS, A. R.; FAVARIN, J. L.; GALLO, L. A.; MORAES, M. F.; TEZOTTO, T.; LAVRES JR., J. 2011. Influence of nitrogen fertilization on nickel accumulation and chemical composition of coffee plants during fruit development. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 34, p. 1853-1866.

REYNOLDS, E. S. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, Philadelphia, v. 17, p. 208, 1963.

SCHNEITER, A. A.; MILLER, J. F. Description of sunflower growth stages. **Crop Science**, Madson, v. 21, p. 901-903, 1981.

SENESI, N.; SPOSITO, G.; HOLTZCLAW, K. M.; BRADFORD, G. R. Chemical properties of metalhumic fractions of a sewage sludge-amended Aridisol. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 18, p. 186-194, 1989.

SILVA, C. A.; VALE, F. R. Disponibilidade de nitrato em solos brasileiros sob efeito da calagem e de fontes e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 2461-2471, 2000.

SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2 ed. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 416 p.

TOLEDO, M. Z.; GARCIA, R. A.; PEREIRA, M. R. R.; BOARO, C. S. F.; LIMA, G. P. P. Nodulação e atividade da nitrato redutase em função da aplicação de molibdênio em soja, **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, p. 858-864, 2010.

URETA, A. C.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; PALACIOS, J. M. *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae symbiotic hydrogenase activity and processing are limited by the level of nickel in agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7603-7606, 2005.

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. Walp). **Plant Physiology**, Rockville, v. 79, p. 474-479, 1985.

WEISSMAN, G.S. Influence of ammonium and nitrato nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. **Plant Physiology**, Rockville, v. 49, p. 138-41, 1972.

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

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

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

YANG, X. E.; BALIGAR, V. C.; FOSTER, J. C.; MARTENS, D. C. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize grown with different nickel levels. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 196, p. 271–276, 1997.

YOSHIKAWA, M.; HIRAI, N.; WAKABAYASHI, K.; SUGIZAKI, H.; IWAMURA, H. 1993. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by *rhizosphere Pseudomonas putida*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 1150-1154, 1993.

YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in Plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 86, p. 1-17, 2011.