

MANOEL MOTA DOS SANTOS

**NITROGÊNIO (^{15}N) E ATIVIDADE DAS ENZIMAS REDUTASE DO NITRATO E
GLUTAMINA SINTETASE NA CULTURA DO MILHO EM PLANTIO DIRETO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237n
2008

Santos, Manoel Mota dos, 1978-

Nitrogênio (^{15}N) e atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase na cultura do milho em plantio direto / Manoel Mota dos Santos – Viçosa, MG, 2008.
x, 44f.: il. ; 29cm.

Orientador: João Carlos Cardoso Galvão

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Milho – Efeito do nitrogênio. 2. Solos – Teor de nitrogênio. 3. Uréia como fertilizante. 4. Adubos e fertilizantes – Aplicação. 5. *Zea Mays* I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.152

MANOEL MOTA DOS SANTOS

**NITROGÊNIO (^{15}N) E ATIVIDADE DAS ENZIMAS REDUTASE DO NITRATO E
GLUTAMINA SINTETASE NA CULTURA DO MILHO EM PLANTIO DIRETO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 19 agosto de 2008

Prof. Glauco Vieira Miranda
Co-Orientador

Prof. Paulo Geraldo Berger

Pesq. Leandro Vagno de Souza

Prof^a. Anastacia Fontanéti

Prof. João Carlos C. Galvão
(Orientador)

A Jesus Cristo.

A minha esposa Clarice

Aos meus pais, Messias e Delvita.

Aos meus irmãos Magno, Deusanira e Amanda.

Aos meus amigos e parentes.

Aos agricultores do Brasil.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de aprender a viver e agradecer àqueles que proporcionam à alegria da vida.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais e amigos Messias e Delvita, pelo apoio, amizade, carinho e por nunca terem medido esforços para tornar meus sonhos realidade.

Aos meus irmãos Magno e Deusanira pelo carinho, amizade e por nunca medir esforços para proporcionar à minha felicidade.

A minha esposa Clarice, pela amizade, carinho, contribuição e apoio em todos os momentos e situações.

Ao professor João Carlos Cardoso Galvão, pela amizade, confiança e, principalmente, pela oportunidade do crescimento acadêmico e profissional.

Ao professor Glauco Vieira Miranda, pela orientação e pelos valiosos ensinamentos.

Aos professores Ivo Ribeiro e Fernando Finger e Valterley S. Rocha, pela amizade, conselhos e, principalmente, pela oportunidade do crescimento científico e profissional.

Em especial, aos amigos Hélio; Ana Celle; Aurélio, Rodrigo Fidelis, Renato, Ronaldo Coimbra; Rubens; Michelli; Heder Braun; Flávio.

Ao Sebastião Canário e família pela amizade e carinho.

Os colegas de república Thiago, Davi, Aurélio, Gleidson, Chicão, pela amizade e agradável companhia.

Aos colegas do Programa Milho, por todos os momentos compartilhados e, principalmente, pela oportunidade ímpar de conviver com todos.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, em especial, a amiga de todos os momentos Mara Rodrigues, Domingos e Itamar, pela ajuda e amizade.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho, o meu reconhecimento e a minha gratidão.

BIOGRAFIA

MANOEL MOTA DOS SANTOS, filho de Messias dos Santos Pinto e Delvita Mota dos Santos, nasceu em 01 de fevereiro de 1978, em Dueré, Tocantins.

Cursou o ensino fundamental em Cristalândia e médio em Gurupi, Tocantins. Em março de 1998, ingressou no curso de Agronomia pela Universidade Estadual do Tocantins (Unitins), em Gurupi, Tocantins.

Em agosto de 2003 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia/Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, defendendo tese em 18 de fevereiro de 2005.

Em março de 2005 iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais sob a orientação do professor João Carlos Cardoso Galvão, defendendo tese em agosto de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas.....	3
Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em épocas de adubações nitrogenadas e molíbdicas na cultura do milho.....	05
Resumo	05
Abstract.....	06
Introdução	07
Material e métodos.....	08
Resultados e discussão.....	12
Conclusões	21
Referências bibliográficas.....	22
Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura e molibdênio na cultura do milho em plantio direto e alocação do nitrogênio (¹⁵N) na planta	24
Resumo	24
Abstract.....	25
Introdução	26
Material e métodos.....	28
Resultados e discussão.....	30
Conclusões	40
Referências bibliográficas.....	41
Conclusões Gerais.....	44

RESUMO

SANTOS, Manoel Mota dos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2008.
Nitrogênio (^{15}N) e atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase na cultura do milho em plantio direto. Orientador: João Carlos Cardoso Galvão; Co-orientadores: Glauco Vieira Miranda, Ivo Ribeiro da Silva e Fernando Luiz Finger.

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando dados do ensaio conduzido na estação experimental de Coimbra – MG, área pertencente à Universidade Federal de Viçosa. Objetivou-se através desta tese: 1 - avaliar o efeito da adubação nitrogenada sobre a atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e Glutamina sintetase (GS) em cultivares de milho em espaçamento reduzido e 2 - avaliar o efeito da época de aplicação de nitrogênio, enriquecida com ^{15}N , sobre a produtividade de grãos e sua distribuição ao longo da planta, na presença e ausência de molibdênio em sistema de semeadura direta na cultura do milho. Para atingir o objetivo 1, o experimento foi conduzido utilizando dois cultivares de milho (AG 9010 e P 3041) e para a conclusão do objetivo 2, o experimento foi realizado utilizando apenas o cultivar AG 9010, porém utilizando a mesma área. O plantio foi realizado em novembro mantendo-se uma população de 50.000 plantas ha^{-1} . A parcela experimental foi composta por oito linhas de 5,0 metros de comprimento com espaçamento de 0,50 m entre as linhas de plantio. A área útil foi de 12 m^2 . A adubação de plantio foi realizada com 380 kg ha^{-1} da formulação 8 -28 -16 para as parcelas que receberam nitrogênio. Para a dose zero de nitrogênio a adubação foi realizada com 106 kg de P_2O_5 , na forma de Superfosfato Simples e 60 kg de K_2O , como Cloreto de Potássio, na parcela. A adubação de cobertura e de plantio com nitrogênio foi realizada com uréia, utilizando 150 kg ha^{-1} , realizando irrigação logo após a aplicação da uréia, conforme descrição de cada tratamento. A época de aplicação do nitrogênio interfere na atividade enzimática independente da adubação com molibdênio. A maior produtividade de grãos e maior atividade da redutase do nitrato foram obtidas com a aplicação de nitrogênio na época de que ao milho apresentou com quatro folhas completamente expandidas. Houve diferença na atividade enzimática entre os cultivares, influenciada pelos ciclos vegetativos. O melhor suprimento de N ao longo do ciclo e a maior produtividade foram obtidos com a aplicação do fertilizante no estágio de quatro folhas expandidas do milho. Não foi encontrado efeito da adubação molíbdica sobre as características avaliadas. A aplicação do N na pré-semeadura do milho, 15 dias antes do plantio, demonstrou não

ser recomendável para as condições de solo e clima estudadas. A parte da planta do milho de maior alocação de N foi o grão. A recuperação média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante, foi de 6 %. A quantidade média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante, foi de 9,21 kg ha⁻¹, mas quando da aplicação da Uréia no estágio de quatro folhas a recuperação chega ao redor de 16%. A matéria orgânica do solo é a principal fonte de N para as plantas de milho.

ABSTRACT

SANTOS, Manoel Mota dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august of 2008.

Evaluation of you cultivate of corn the application of Nitrogen and molibdênio and effect on the activity of the enzymes nitrate redutase and glutamina sintetase. Adviser: João Carlos Cardoso Galvão; Co-advisers: Glauco Vieira Miranda, Ivo Ribeiro da Silva and Fernando Luiz Finger.

This work was developed using data of the rehearsal conducted in the experimental station of Coimbra-MG, area belonging to Federal University of Viçosa. It was aimed at through this theory: 1 - to evaluate the effect of the Nitrogen manuring on the activity of the enzymes nitrate redutase (NR) and Glutamina sintetase (GS) in corn cultivars in reduced spacing and 2 - to evaluate the effect of the time of application of Nitrogen, enriched with ^{15}N , on the productivity of grains and it's distribution along the plant, in the presence and Molibdenium absence in system of direct sowing in the culture of the corn. To reach the 1 main, the experiment was conducted using two corn cultivars (AG 9010 and P 3041) and for the conclusion of the objective 2, the experiment was accomplished just by using AG 9010 cultivar, however using the same area. The planting was accomplished in November staying a population of 50.000 plants ha^{-1} . The experimental portion was composed by eight lines of 5,0 meters in length with spacing of 0,50 m among the planting lines. The useful area was 12 m^2 . The planting manuring was accomplished with 380 kg ha^{-1} of the formulation 8 -28 -16 for the plots that received Nitrogen. For the zero dose of Nitrogen the manuring was accomplished with 106 kg of P_2O_5 , in the form of Simple Superfosfato and 60 kg of K_2O , as Chloride of Potassium, in the plots. The covering and planting manuring with Nitrogen was accomplished with urea, using 150 kg ha^{-1} , accomplishing irrigation just after the application of urea, according to description of each treatment. The time of application of the Nitrogen interferes in the independent enzymatic activity of the manuring with Molibdenium. The largest productivity of grains and larger activity of the redutase of the nitrate was obtained with the application of Nitrogen at time the corn presented with four leaves completely expanded. There was difference in the enzymatic activity among them cultivars, influenced by the vegetative cycles. The best supply of N during the cycle and the largest productivity was obtained with the application of the fertilizer in the stadium of four expanded leaves of the corn. It was not found effect of the manuring of Molibdenium on the appraised characteristics. The application of N in the pre-sowing of the corn, 15 days before the planting, it demonstrated not to be advisable for

the soil conditions and climate studied. The part of the corn plant with larger allocation of N was the grain. The medium recovery of Nitrogen in the originating from plant the fertilizer, was 6%. The medium amount of Nitrogen in the originating from plant the fertilizer, was 9,21 kg ha⁻¹, but when of the application of urea in the stadium of four leaves the recovery arrives around 16%. The organic matter of the soil is the main source of N for the corn plants.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a área plantada com milho no Brasil é de 14.605,4 milhões de hectares (CONAB, 2008), no entanto, não é suficiente para atender as demandas do mercado interno, gerando problemas de abastecimento para a indústria nacional. A solução para esse problema passa pela expansão da área plantada e pelo aumento da produtividade das áreas atualmente cultivadas, melhorando os cultivares atuais e os tratos culturais, como a adubação balanceada e a utilização de espaçamento entre linhas de plantio e população adequada. Afora a sua elevada importância no agronegócio, o milho também é uma das culturas mais cultivadas pela agricultura familiar brasileira, tanto para a subsistência quanto para a venda local (SOUZA & BRAGA, 2004).

A produção de milho é influenciada pelas características da planta, das condições climáticas, das condições do solo e pela adubação. Entre os nutrientes, o nitrogênio merece destaque, pois participa diretamente do metabolismo da planta, sendo a época de aplicação fator primordial para sua elevação no teor de matéria seca (MARSCHNER, 1995).

No sistema plantio direto uma das primeiras alterações em relação ao sistema convencional é a manutenção dos restos culturais sobre a superfície do solo. Com isso, toda a dinâmica dos nutrientes é alterada, inclusive a do N, especialmente pelo aumento da matéria orgânica (M.O.) do solo (MACHADO, 1976; SÁ, 1993) e pela manutenção da cobertura morta, com conseqüente aumento da atividade biológica, redução das perdas do solo e nutrientes, além do favorecimento do micro clima na superfície do solo (CATTELAN & VIDOR, 1990; BALLOTA et al., 1996).

A aplicação de fertilizantes, em especial os nitrogenados, é uma prática que vem sendo estudado com afinco, em função das grandes variações a que está sujeita como a época de aplicação, a fonte do fertilizante aplicado, a forma como esse nutriente é aplicado ao solo e das interações da planta com o ambiente. Até a emissão da quarta folha a absorção e a demanda de nutrientes pela planta de milho é pequena, havendo um grande aumento na absorção e na necessidade dos mesmos quando da emissão da quinta folha, fase a partir da qual os nutrientes devem estar disponíveis à planta, para que a produtividade não seja negativamente afetada (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000). Na região Sul do Brasil, algumas pesquisas realizadas têm demonstrado vantagens na aplicação do N em pré-semeadura do milho em sistema de plantio direto (SÁ, 1996); a necessidade de aumento da

dose de N no momento da semeadura para suprir a carência inicial decorrente da imobilização microbiana (PÖTTKER & ROMAN, 1994; ARGENTA & SILVA, 1999, SANTOS et al., 2007). Entretanto, muitas variáveis condicionam a dinâmica do N no sistema plantio direto - SPD, principalmente o tipo de solo, o manejo e a precipitação (BASSO & CERETTA, 2000). Além dessas, recentemente, AMADO et al., (2002) demonstraram a importância de considerar a cultura antecessora ao milho para o manejo do N no sistema plantio direto - SPD.

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade final das culturas. A rota de assimilação do nitrato em plantas superiores envolve dois estágios sequenciais. A conversão do nitrato à amônia, mediada pela nitrato redutase (RN), a qual reduz nitrato a nitrito, e pela nitrito redutase, que converte nitrito à amônia. O amônio é então assimilado nos aminoácidos glutamina e glutamato, os quais servem para translocar nitrogênio orgânico de fontes para drenos. As principais enzimas envolvidas são a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Um micronutriente que tem papel importante no metabolismo da planta de milho é o molibdênio, pois exerce papel indispensável na assimilação do nitrato absorvido pelas plantas, atuando a nível da redutase do nitrato. Portanto, qualquer deficiência do elemento pode comprometer o metabolismo do nitrogênio, diminuindo o rendimento das culturas. A faixa crítica de concentração de molibdênio no milho é de 0,1 a 0,2 mg kg⁻¹ (DIOS e BROYER, 1965). Segundo MARSCHNER (1995), a deficiência de molibdênio é frequentemente observada em milho desenvolvido em solos minerais com grande quantidade de óxidos hidratados de ferro reativos e, portanto, com alta capacidade para adsorver íons molibdato (MoO₄²⁻).

A adubação é fator limitante para a elevação da produtividade de qualquer cultura. Hoje, devido às grandes produtividades esperadas para a cultura do milho, tem-se recomendado doses de N, aplicadas em cobertura, de até 140 kg ha⁻¹, dependendo da classe de resposta esperada e do nível tecnológico (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000).

No desenvolvimento da cultura, o acúmulo de Matéria Seca - MS do milho processa-se de forma contínua até o estágio de maturação dos grãos, sendo mais intenso próximo ao florescimento; depois do florescimento, ocorre também a translocação dos compostos acumulados da parte vegetativa para os grãos em formação (HAY et al., 1953; FURLANI et al., 1977). A condição de *stay-green* que é uma característica genética que dá à planta

condição de maior período de esverdeamento das folhas e colmos mesmo após a maturação fisiológica do grão, podendo com isso favorecer o acúmulo de matéria seca (SILVA et al., 2008, DUVICK (1992), RUSSELL (1986).

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram: avaliar épocas de adubação nitrogenada nos componentes de produção de cultivares de milho em espaçamento reduzido associado ou não com molibdênio; avaliar o efeito da adubação nitrogenada sobre a atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e Glutamina sintetase (GS) em cultivares de milho e de avaliar o efeito da época de aplicação de nitrogênio, enriquecida com ^{15}N , sobre a produtividade de grãos e sua distribuição ao longo da planta, na presença e ausência de adubação de molibdênio em sistema de semeadura direta na cultura do milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J. & AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. R. Bras. Ci. Solo, 26:241-248, 2002.

ARGENTA, G. & SILVA, P.R.F. Adubação nitrogenada em milho implantado em semeadura direta após aveia preta. Ci. Rural, 29:745-754, 1999.

BALLOTA, E.L., ANDRADE, D.S., COLOZZI FILHO, A. Avaliações microbiológicas em sistemas de preparo do solo e sucessão de culturas, m: CONGRESSO BRASILEIRO PLANTIO DIRETO PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL, 1996, Ponta Grossa, PR. Resumos expandidos... Ponta Grossa, IAPAR, 1996. v. I. p.9-11.

BASSO, C.J. & CERETTA, C.A. Manejo do nitrogênio no milho em sucessão a plantas de cobertura no solo, sob plantio direto. R. Bras. Ci. Solo, 24:905-915, 2000.

CATTELAN, A.J., VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. R bras Ci Solo, Campinas, v.14, p.125-132, 1990.

CONAB - Acompanhamento da safra brasileira: grãos: oitavo levantamento, maio 2008 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2008. Disponível também em: www.conab.gov.br.

DIOS, R. V.; BROYER, T. C. Deficiency symptoms and essentiality of molybdenum in corn hybrids. Agrochimica, Pisa, v.9, n.3, p.273, 1965.

DUVICK, D. N. Genetic contributions to advances in yield of U.S. maize. Maydica, Bergamo, v.37, n.1, p.69-79, 1992.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de Milho. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

- FURLANI, P. R.; HIROCE, R.; BATAGLIA, O. C.; SILVA, W. J. Acúmulo de macronutrientes, de silício e de matéria seca por dois híbridos simples de milho. *Bragantia*, Campinas, v. 36, n. 22, p. 223 - 229, 1977.
- HAY, R. E.; EATLEY, E. B.; de TURK, E. E. Concentration and translocation of nitrogen compounds in the corn plant (*Zea mays*) during grain development. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 28, p. 606 - 621, 1953.
- MACHADO, J.A. Efeito dos sistemas de cultivo reduzido e convencional na alteração de algumas propriedades físicas e químicas do solo. Santa Maria, RS, 1976. 129 p. Tese (Livre docência)- Universidade Federal de Santa Maria, 1976.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. London Academic Press Limited, 1995, 889p.
- PÖTTKER, D. & ROMAN, E. Efeito dos resíduos de culturas e do pousio de inverno sobre resposta do milho a nitrogênio. *Pesq. Agropec. Bras.*, 29:763-770, 1994.
- RUSSELL, W. A. Contribution of breeding to maize improvement in the United States, 1920s-1980s. *Iowa State Journal of Research*, Ames, v.61, n.1, p.5-34, 1986.
- SÁ, J. C. M. Manejo da fertilidade do solo no plantio direto. Castro, Aldeia Norte/Fundação ABC, 1993. 96p.
- SÁ, J. C. M. Manejo do nitrogênio na cultura do milho no sistema plantio direto. Passo Fundo, Aldeia Norte, 1996. 24p.
- SILVA, J. A. G. da; CARVALHO, F. I. F. de; OLIVEIRA, A. C.de; HARTWIG, I.; BERTAN, I.; CAETANO, V. da R. ; SCHIMDT, D. A.M.; VALÉRIO, I. P.; RIBEIRO, G.; BUSATO, C.C. Caráter stay-green e seu efeito no rendimento de grãos em trigo. *Bragantia* (São Paulo), v. 67, p. 693-699, 2008.
- SOUZA, P. M & BRAGA, M. J. Aspectos econômicos da produção de comercialização do milho no Brasil, In: GALVÃO, J. C. C. & MIRANDA, G. V. (editores). *Tecnologias de produção do milho*. Editora UFV, 2004, 366p.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2004.

ATIVIDADE DAS ENZIMAS REDUTASE DO NITRATO E GLUTAMINA SINTETASE EM ÉPOCAS DE ADUBAÇÕES NITROGENADAS E MOLÍBDICAS NA CULTURA DO MILHO

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adubação nitrogenada sobre a atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e Glutamina sintetase (GS) em cultivares de milho e avaliar o efeito da adubação sobre a produtividade de grãos. O experimento foi conduzido no ano agrícola de 2006/07, na Estação Experimental de Coimbra. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, no esquema fatorial $3 \times 2 \times 2 + 2$, sendo formada por 3 épocas de adubação nitrogenada: (15 dias antes do plantio, logo após o plantio e na 4ª folha completamente expandida), 2 cultivares: P 3041 e AG 9010 e; dois modos de adubação de molibdênio (ausente e presente) e uma testemunha para cada cultivar e quatro repetições. O plantio foi realizado em novembro mantendo-se uma população de 50.000 plantas ha^{-1} . A parcela experimental foi composta por oito linhas de 5,0 metros de comprimento com espaçamento de 0,50 m entre as linhas de plantio. A área útil foi de 12 m^2 . A adubação de plantio foi realizada com 380 da formulação 8 -28 -16 para as parcelas que receberam nitrogênio. Para a dose zero de nitrogênio a adubação foi realizada com 106 kg de P_2O_5 , na forma de Superfosfato Simples e 60 kg de K_2O , como Cloreto de Potássio, na parcela. As adubações de cobertura e de plantio com nitrogênio foi realizada com uréia, utilizando-se 150 kg ha^{-1} , realizando irrigação logo após a aplicação da uréia, conforme descrição de cada tratamento. O Mo foi aplicado como molibdato de sódio por via foliar (90 g ha^{-1}), aos 25 dias após a emergência (DAE), nos respectivos tratamentos. A aplicação de molibdênio (90 g ha^{-1}) não influenciou na atividade da enzima nitrato redutase. A maior produtividade de grãos e maior atividade da glutamina sintetase foram obtidas com a aplicação de nitrogênio na época de que ao milho apresentava com quatro folhas completamente expandidas. O excesso de chuvas foi um fator que contribuiu para a baixa produtividade de grãos.

Palavras chaves – *Zea mays*, épocas de adubação com N, espaçamento reduzido

ACTIVITY OF THE REDUTASE OF NITRATE AND GLUTAMINA SINTETASE ENZYME IN DIFERENT TIMES OF NITROGEN AND MOLIBDENIUM FERTILIZATION.

SUMMARY

The main of this work was to evaluate the effect of the manuring nitrogen on the activity of the enzymes nitrate redutase (NR) and Glutamina sintetase (GS) in corn cultivars and to evaluate the effect of the manuring on the productivity of grains. The experiment was conducted in the agricultural year of 2006/07, in the Experimental Station of Coimbra. The experimental design was randomized blocks, in the factorial schedule $3 \times 2 \times 2 + 2$, being formed by 3 times of manuring nitrogen: (15 days before the planting, just after the planting and in the 4th leaf completely expanded), 2 cultivars: P 3041 and AG 9010 and; two way of molybdenum manuring and a testify for each to cultivate and four repetitions. The planting was accomplished in November staying a population of 50.000 plants ha^{-1} . The experimental portion was composed by eight lines of 5,0 meters in length with spacing of 0,50 m among the planting lines. The useful area was 12 m^2 . The planting manuring was accomplished with 380 of the formulation 8 -28 -16 for the portions that received nitrogen. The manuring for the zero dose of nitrogen was accomplished with 106 kg of P_2O_5 , in the form of Simple Superphosfat and 60 kg of K_2O , as Chloride of Potassium, in the plots. The covering manuring and of planting with nitrogen was accomplished with urea, using 150 kg ha^{-1} , accomplishing irrigation just after the application of the urea, according to description of each treatment. The molybdenum was applied as molibdato of sodium on the leaves (90 g ha^{-1}), on the 25 days after the emergency (DAE), in the respective treatments. The molybdenum application (90 g ha^{-1}) didn't influence in the activity of the nitrate redutase enzyme. The largest productivity of grains and larger activity of the glutamina sintetase was obtained with the application of nitrogen at time the corn presented four leaves completely expanded. The excess of rains was a factor that contributed to the low productivity of grains.

Key words - fertilization times with N, reduced spacing, *Zea mays*

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) representa papel fundamental por sua atuação decisiva no metabolismo das plantas, notadamente na síntese de proteínas. Considerado o nutriente mais importante tanto no incremento da produção de grãos como na elevação do teor protéico, é também, o elemento que mais onera o custo de produção para a cultura do milho. Os gastos envolvendo adubações nitrogenadas e potássica variam de 20 a 28%, segundo PAVINATO et al. (2008), sendo interessante a busca de cultivares responsivos a aplicação de nitrogênio.

Em relação à atividade enzimática sabe-se que a redutase do nitrato (NR) é a enzima catalisadora da conversão do N inorgânico na forma de nitrato (NO_3^-) para a forma de nitrito (NO_2^-). O nitrito formado é exportado para o cloroplasto e, posteriormente, transformado em amônio (NH_4^+) pela ação do nitrito redutase. A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade das culturas. A rota de assimilação do nitrato em plantas superiores envolve dois estágios sequenciais. A conversão do nitrato à amônia, mediada pelo nitrato redutase (NR), a qual reduz nitrato a nitrito, e pelo nitrito redutase, que converte nitrito à amônia. A amônia é então assimilada nos aminoácidos glutamina e glutamato, os quais servem para translocar nitrogênio orgânico de fontes para drenos. As principais enzimas envolvidas são a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A GS ocorre em folhas de milho como duas isoformas: uma citoplásmica (GS1) e outra cloroplastídica (GS2) (LEA & AZEVEDO, 2007). Aparentemente, o papel da GS2 é assimilar a amônia gerada a partir da redução do nitrato ou liberada durante o processo de fotorrespiração da glicina (MIFLIN & LEA, 1980), enquanto altos níveis de atividade de GS1 são observados em resposta ao acúmulo de amônia devido ao processo de degradação de proteínas em plantas senescentes (KAWAKAMI & WATANABE, 1988; SAKAKIBARA et al., 1992) ou sob deficiência de N (PURCINO et al., 1992). Duas formas de GOGAT são conhecidas em função dos seus doadores de elétrons: uma dependente de NAD(P)H (NAD(P)H-GOGAT) e outra dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT). Em tecidos

fotossintéticos, esta última contribui com aproximadamente 96% da atividade total da GOGAT, sendo a atividade restante derivada da NADH-GOGAT (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O molibdênio exerce papel indispensável na assimilação do nitrato absorvido pelas plantas, atuando a nível da redutase do nitrato. Além do mais, interfere diretamente no crescimento e desenvolvimento do milho e, conseqüentemente, na produção de grãos, por meio do metabolismo do nitrogênio, visto que o micronutriente é componente da enzima redutase do nitrato, responsável pela redução do nitrato absorvido para nitrito e posteriormente a NH_3 (MARSCHNER, 1995). Portanto, qualquer deficiência do elemento pode comprometer o metabolismo do nitrogênio, diminuindo a produtividade das culturas.

A faixa crítica de concentração de molibdênio no milho é de 0,1 a 0,2 mg kg^{-1} (DIOS e BROYER, 1965). Segundo MARSCHNER (1995), a deficiência de molibdênio é freqüentemente observada em milho desenvolvido em solos minerais com grande quantidade de óxidos hidratados de ferro reativos e, portanto, com alta capacidade para adsorver íons molibdato (MoO_4^{2-}).

Na literatura brasileira, há poucos trabalhos relativos à aplicação do molibdênio na cultura do milho (GALRÃO, 1984; TEIXEIRA, 2006; FERREIRA, 2001), na maioria deles, não foi verificada melhoria do crescimento da planta ou da produção de grãos. Entretanto, ARAÚJO et al. (1996), COELHO (1997) e FERREIRA (2001), em Viçosa-MG, obtiveram incrementos de produtividade do milho com diferentes doses de adubação molibídica, ocorrendo variação entre anos, podendo ser influenciado, provavelmente pela variação de chuvas e outros fatores ambientais, como temperatura, luminosidade.

Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito do molibdênio e da época de adubação nitrogenada sobre a atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e Glutamina sintetase (GS) em cultivares de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no ano agrícola 2006/07, na Estação Experimental de Coimbra pertencente à Universidade Federal de Viçosa, situada no município de Coimbra, na Zona da Mata de Minas Gerais, caracterizada pelas coordenadas geográficas 20° 50' 30'' de latitude Sul e 42° 48' 30'' de longitude Oeste, altitude de 715 metros, em solo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, fase terraço. Na camada de zero a 10 cm o

solo apresentou as seguintes características: 70 % de argila; pH em água de 5,5; 19,4 mg/ dm³ de P (Mehlich 1); 135,0 mg/ dm³ de K; 0,1 cmol_c/dm³ de Al; 1,6 cmol_c/dm³ de Ca; 0,7 cmol_c/dm³ de Mg e 2,1 dag/kg de MO. Os dados de precipitação e de temperatura, em decêndios, medidas na estação experimental de Coimbra, estão representados na Figura 1.

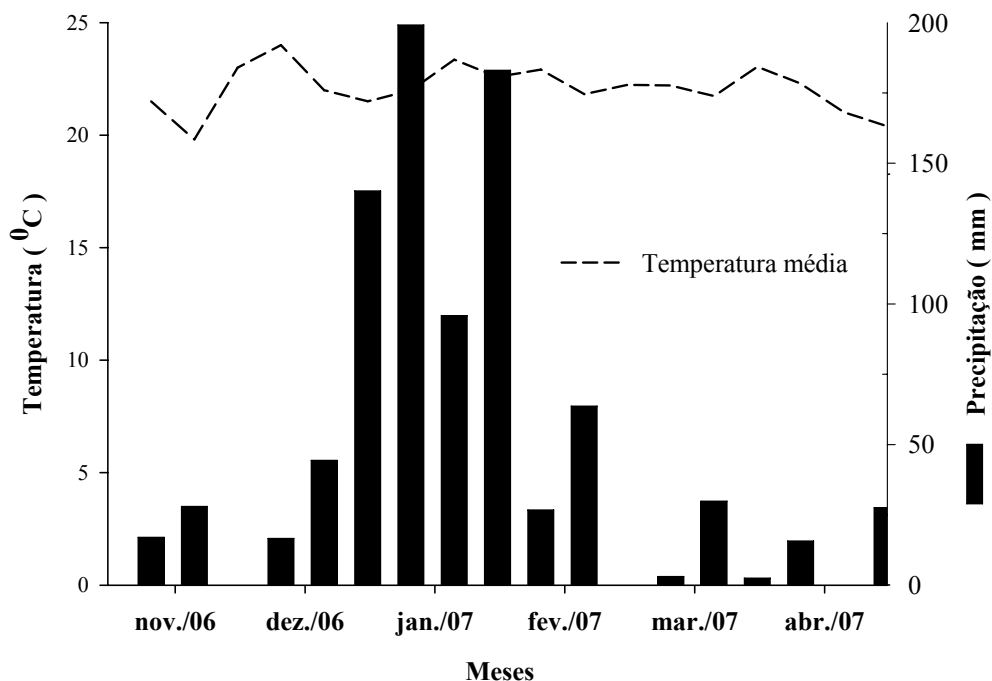


Figura 01 - Precipitação (mm) e temperatura média em decêndio (° C), observadas durante a condução do experimento em 2006/07.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com três repetições, no esquema fatorial 3 x 2 x 2 + 1; três épocas de aplicação de N; na ausência e na presença de adubação com molibdênio (Mo); dois cultivares de milho e uma testemunha sem fertilização. Os tratamentos consistiram de: **T1**- aplicação total de nitrogênio 15 dias antes do plantio, sem molibdênio; **T2**- aplicação total de nitrogênio no plantio, sem molibdênio; **T3**- aplicação total de nitrogênio na época em que o milho se encontrava com quatro folhas completamente desenvolvida sem molibdênio; **T4**- aplicação total de nitrogênio 15 dias antes do plantio, com molibdênio; **T5**- aplicação total de nitrogênio no plantio, com molibdênio; **T6**- aplicação total de nitrogênio na época em que o milho se encontrava com quatro folhas completamente desenvolvida com molibdênio **T7**- testemunha sem nitrogênio e sem aplicação de Mo, repetido para cada cultivar. O plantio foi realizado em novembro (30/11/2006) sobre palhada

de aveia em sistema de plantio direto, mantendo-se uma população de 50.000 plantas ha^{-1} . A parcela experimental foi composta por oito linhas de 5,0 metros de comprimento com espaçamento de 0,50 m entre as linhas de plantio. A área útil de cada parcela era de 12 m^2

A adubação de plantio foi realizada com 380 kg ha^{-1} da formulação 8 -28 -16 para as parcelas que receberam nitrogênio. Para a dose zero de nitrogênio a adubação foi realizada com 106 kg de P_2O_5 , na forma de Superfosfato Simples e 60 kg de K_2O , como Cloreto de Potássio, na parcela. A adubação de cobertura e de plantio com nitrogênio foi realizada com uréia, utilizando 150 kg ha^{-1} para ambas as cultivares de milho (AG 9010 e P 3041), realizando irrigação logo após a aplicação da uréia, conforme descrição de cada tratamento. O Mo foi aplicado como molibdato de sódio por via foliar (90 g ha^{-1}), aos 25 dias após a emergência (DAE), de acordo com PEREIRA, (1997), nos respectivos tratamentos.

A semeadura foi feita utilizando cinco sementes/metro lineares com espaçamento entre plantas de 0,50m, realizando desbaste manualmente, aproximadamente 30 dias após o plantio, deixando-se uma planta a cada 30 cm ou duas quando ocorrerem falhas, visando uma densidade na colheita de 50.000 plantas por ha^{-1} .

As plantas daninhas foram controladas por capinas químicas utilizando o herbicida proveniente da mistura atrazine + nicosulfuron (Siptran (3,0 l/ha) e Sanson (300 ml/ha)), respectivamente. Não houve necessidade de realizar o controle de insetos-pragas.

Para a determinação da RN, seguiram-se as recomendações de COELHO (1997), quanto a folha a ser amostrada, a hora do dia para a amostragem das folhas, a concentração de nitrato na solução de incubação e o intervalo de tempo para a incubação dos discos foliares, com a finalidade de se obterem maiores valores de atividade enzimática.

As amostragens foram realizadas aos 45, 60, 75 e 90 dias após a emergência das plântulas, retirando-se, de quatro folhas por parcela, completamente desenvolvidas, a partir do ápice. Logo após a coleta, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos, previamente identificados, os quais foram colocados em caixa de isopor com gelo e, em seguida, transportado para o laboratório, uma vez que, nessa técnica, a atividade enzimática é determinada “in vivo”. As amostragens foram efetuadas sempre às 14 horas, pois este foi o horário identificado como o de maior atividade da redutase de nitrato em milho, de acordo com (PEREIRA, 1997).

No laboratório, utilizando-se um furador de rolhas retirou-se 40 discos de 8 mm de diâmetro, por parcela, sendo cinco discos por folhas, os quais foram pesados para obtenção da

matéria fresca. Posteriormente, os discos foram colocados no meio de incubação, com a seguinte composição: 5 ml de tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0,2 mol/L, pH 7,5; 2,5 ml de propanol a 8%; 1 ml de água destilada e 1,5 ml de KNO_3 na concentração de 75 mmol/L; e duas gotas de Triton X100. Em seguida, as amostras foram submetidas por duas vezes, a um ambiente com vácuo durante 30 segundos, para maior contato do meio com as células do mesófilo foliar.

Posteriormente, colocou-se o recipiente com as amostras em banho-maria, a 30°C. Após 10 e 40 minutos, retirou-se 1 ml de meio de incubação, utilizando-se uma micropipeta automática, transferindo-o para um tubo de ensaio, contendo 1 ml de sulfanilamida na concentração de 1% em HCl 3 mol/L e 1 ml de água destilada. Terminando este procedimento, para todas as parcelas, acrescentou-se 1 ml de N-1-naftileno diamina 0,02% em cada tubo de ensaio e promovendo-se uma agitação em vórtex durante, aproximadamente, 20 segundos. Após a agitação os tubos de ensaio as amostras ficaram em repouso durante uma hora, para haver a estabilização da reação de 1 ml de N-1-naftileno diamina 0,02% com o nitrito formado a partir da redução do nitrato, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

A atividade da enzima foi determinada pela quantidade de nitrito (NO_2^-) produzida, comparando os valores obtidos com uma curva padrão para esse íon, previamente estabelecidos e convertidos em atividade da redutase do nitrato em micromoles de nitrito por hora, por grama de matéria fresca ($\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ H}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$).

A atividade específica da sintetase da glutamina foi obtida utilizando o método proposto por ELIOTT (1953), o qual explora a atividade biossintética dessa enzima na formação de γ – glutamil-hidroxamato.

De cada amostra, foi coletado material vegetal na forma de discos de folhas, o qual foi fracionado e submetido a uma pequena quantidade de nitrogênio líquido durante a maceração, adicionando 2,0 ml da solução de extração, antes desse processo.

O material foi homogeneizado e depois centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos a 4° C. O material sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio e acondicionado em recipiente com gelo moído e, em seguida, realizada a determinação enzimática.

Essa reação foi realizada sob agitação contínua em banho-maria a 30° C em tubo de ensaio, no qual foram adicionados 0,25 ml de tampão TRIS - HCL 200 mM, pH 7,5; ,1 ml de ATP 50 mM, pH 7,0; 0,25 ml de glutamato de sódio 500 mM; 0,05 ml de MgSO_4 ; 0,05 ml de

cisteína 100 mM; 0,15 ml de hidroxilamina 100 mM, pH 7,0 e 0,15 ml de extrato, totalizando 1 mililitro (ml).

Após o período de incubação em “banho maria” (20 minutos) a reação foi interrompida pela adição de 1 ml do reagente cloreto – FeCl₃ (10%)/ TCA (24%)/ HCL (6N), 1:1:1 – formando um complexo marrom amarelado como precipitado. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm e no material sobrenadante foi realizada a leitura colorimétrica para determinar a formação de γ – glutamil-hidroxamato.

A leitura foi feita a 540nm em espectrofotômetro, utilizando-se o coeficiente de extinção do glutamil-hidroxamato ($700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ou $0,7 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como curva padrão, para comparação dos resultados lidos no espectrofotômetro. A atividade da GS foi expressa em μmoles de glutamil-hidroxamato (GGH) produzido por grama de matéria fresca por minuto ($\mu\text{moles GGH g}^{-1} \text{ m f}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Além das leituras enzimáticas, também foram realizadas avaliações para as características de produção dos cultivares de milho, em (kg ha^{-1}): a produtividade foi realizada utilizando o peso total de grãos da parcela (12 m^2) e extrapolando os resultados para a produtividade de um hectare, corrigindo a umidade para 13%.

A colheita foi realizada manualmente quando os grãos atingiram umidade em torno de 20%, a debulha das espigas foi efetuada com trilhadeira estacionária, simulando a colheita mecânica por colheitadeira e os dados de peso de grãos corrigidos para umidade de 13%.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e de regressão seguindo o delineamento em blocos ao acaso. Na comparação das médias, foi usado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeitos quadráticos e cúbicos para a atividade da redutase do nitrato (Figuras 2 e 3, e Tabela 1). Observou-se comportamento semelhante para ambos os tratamentos, dentro de cada cultivar (AG 9010 representado pelas figuras 2a e 2b e P3041, figuras 3a e 3b), sendo os menores valores observados para o tratamento testemunha e os maiores valores para a atividade da RN encontrados para os tratamentos que receberam N em cobertura (T3 e T6), seguidos da aplicação de N no plantio (T2 e T5) independente da aplicação de Mo. Além do mais, os resultados mostram uma redução dessa atividade aos 60 DAE em ambos os

tratamentos, possivelmente devido relação fonte-dreno ocorrida na época do florescimento que coincidiu com a avaliação realizada aos 60 DAE.

É sabido que o Mo pode influenciar puramente como catalisador na reação de redução do NO_3^- , para NO_2^- , pela enzima redutase do nitrito, e, também, pode influenciar no “input” da ativação dessa enzima, sendo observados alguns efeitos positivos da adubação molíbdica na ARN em plantas. A não expressão desse efeito ativador, neste trabalho, pode ser influenciada pela baixa dose utilizada (90 g ha^{-1}) ou também pelo excesso de umidade do solo, devido a elevadas precipitações ocorrida durante a condução do experimento (Figura 1), interferindo no processo de nitrificação do N e até mesmo potencializando perdas por lixiviação. Além do mais, a aplicação de N sobre a palhada de aveia-preta, no sistema plantio direto, pode influenciar na elevação de perdas por volatilização do N, conforme observado por CANTARELLA (2007), este efeito pode está contribuindo com os resultados encontrados nesse trabalho. De acordo com MARSCHNER (1995), TAIZ & ZEIGER (2004) e EPSTEIN e BLOOM (2006), a redutase do nitrito é induzida por NO_3^- e inibida por NH_4^+ .

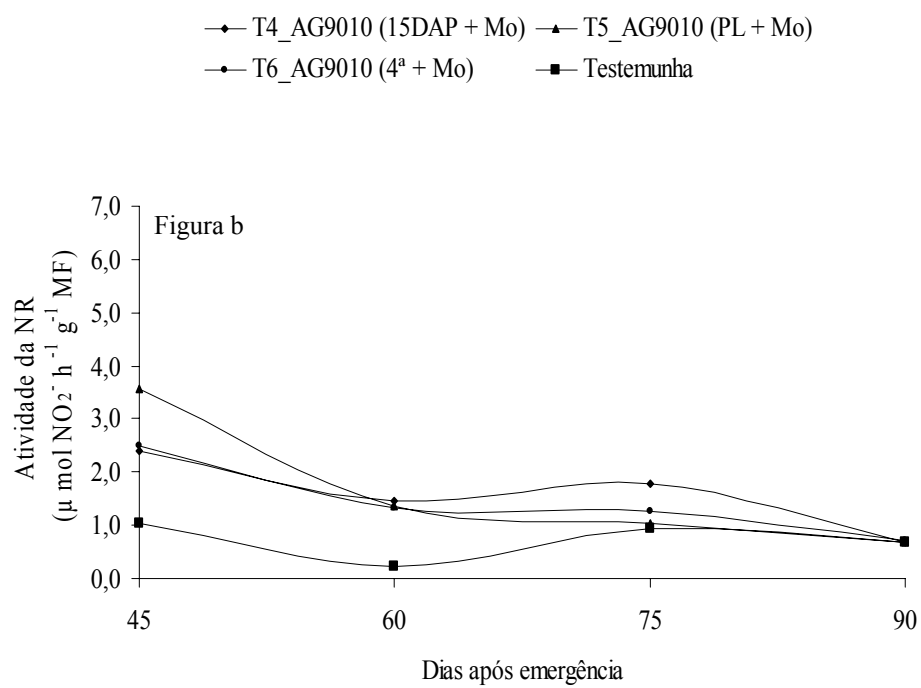
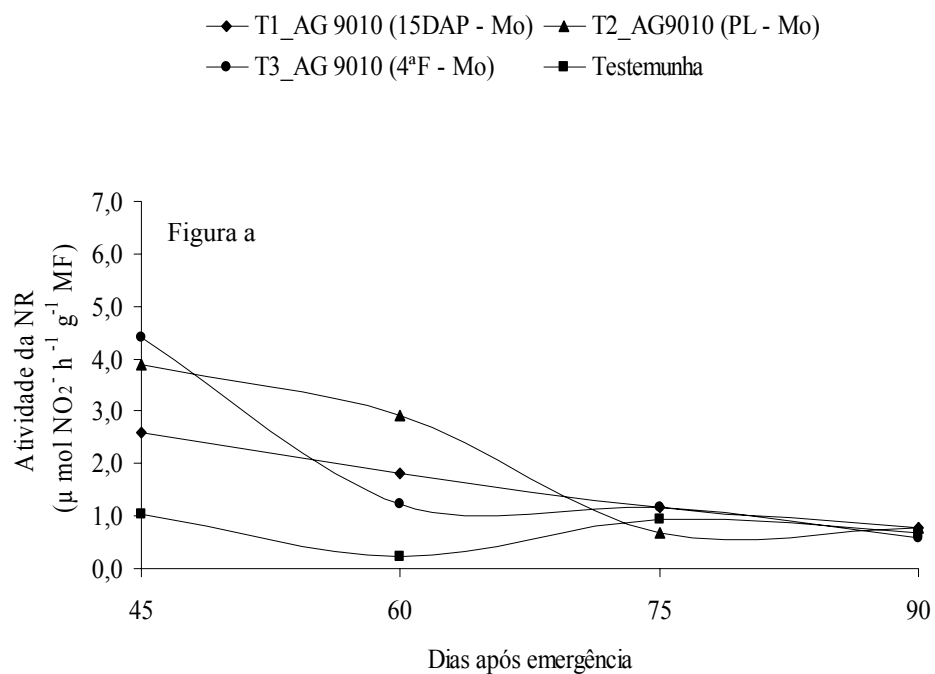


Figura 2. Atividade da enzima redutase nitrato (ARN), do cultivar de milho (AG9010), em função da adubação nitrogenada e molíbdica.

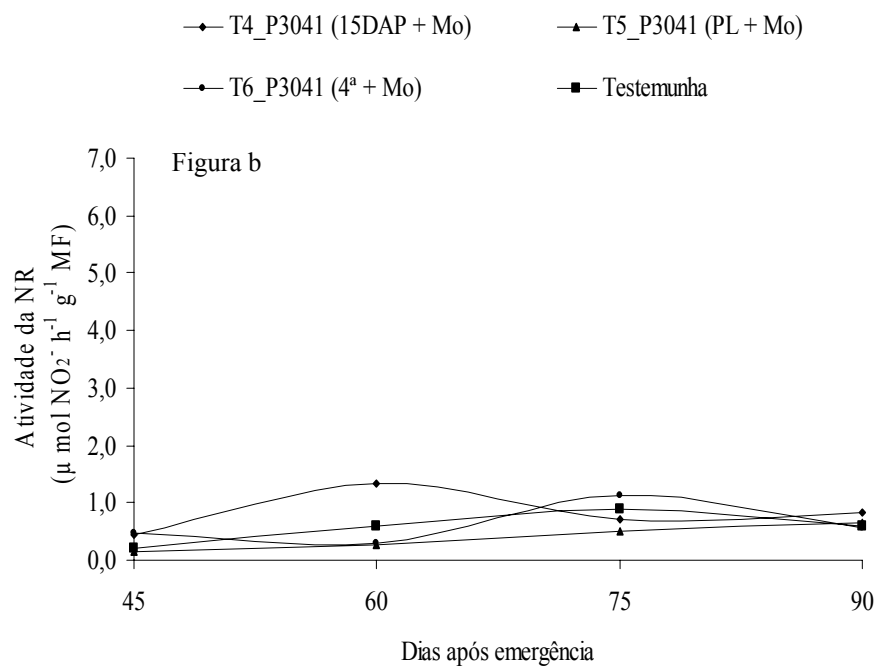
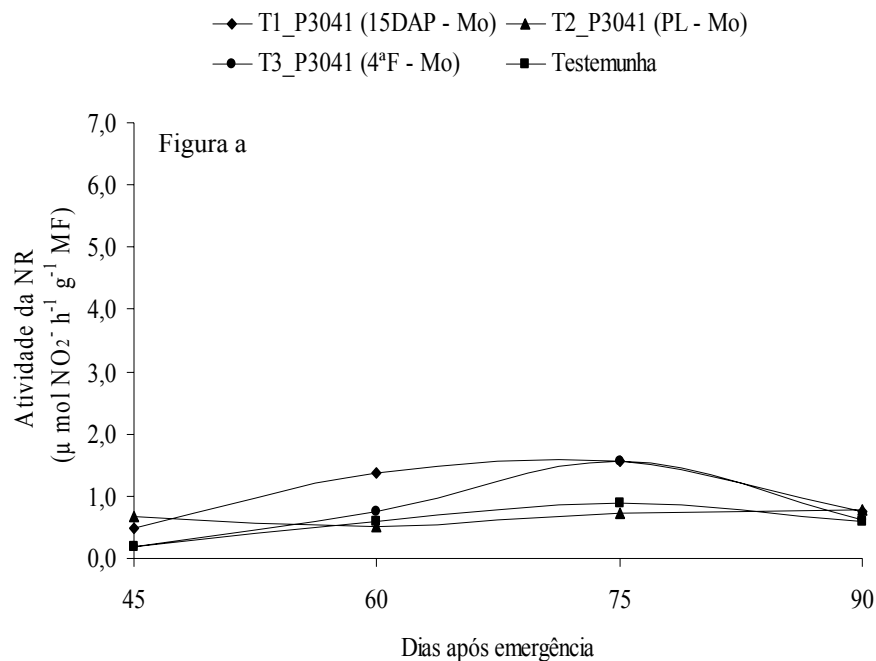


Figura 3. Atividade da enzima redutase nitrato (ARN), do cultivar de milho (P3041), em função da adubação nitrogenada e molibídica.

A ausência de resposta da aplicação de Mo é devido ao suprimento desse micronutriente pelas sementes serem suficiente para ativar o metabolismo da planta, atuando como co-fator na atividade do nitrato redutase, porém, não interferindo na produtividade. Esses resultados são semelhantes aos encontrados pela grande maioria de trabalhos na

literatura, no entanto, ARAÚJO et al. (1996), COELHO (1997) e FERREIRA (2001), em Viçosa-MG, obtiveram incrementos de produtividade do milho com a adubação molíbdica, quando utilizaram doses crescentes de Mo e LANA et al.(2007), em Uberlândia-MG, quando utilizaram coquetéis de Mo e Co, associado a adubação nitrogenada utilizada de acordo com recomendações agronômicas.

Os valores da ARN variaram de 0,20 a 4,42 ($\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$) entre os tratamentos. As menores ARN foram obtidas nos tratamentos controle (testemunha), indicando que a expressão da ARN pode ser influenciada pela absorção de nitrogênio e do molibdênio. Apesar da existência da atividade enzimática, esses valores são considerados baixos, sendo influenciados possivelmente, pelo excesso de chuvas (Figura 1), como também, pela baixa quantidade de Mo aplicado na planta, conforme já comentado anteriormente. PEREIRA (1997), também encontrou baixas respostas da ARN, o mesmo associou esse efeito aos fatores edafoclimáticos, principalmente, o excesso de chuvas ocorrido durante a condução do experimento. Segundo REDINBAUGH & CAMPBELL (1991), o nitrato redutase é uma enzima induzida, caracteristicamente, pelo seu substrato. A expressão dessa enzima, mesmo em condições de baixas concentrações de nitrogênio é devido ao fato da mesma ser uma enzima que se caracteriza como carregadora constitutiva de alta afinidade (LEA & AZEVEDO, 2007). Em relação às épocas de aplicação do N, houve tendência para melhor resposta ao N aplicado quando o milho apresentava-se com quatro folhas completamente desenvolvida, provavelmente devido à maior disponibilidade de N no solo, facilitando a absorção e conseqüentemente transporte e armazenamento na forma de aminoácidos nas folhas do milho.

Para a resposta dos cultivares de milho à ARN, observou-se que ambos apresentaram comportamento diferente quanto à utilização do N, no início da avaliação. Para cultivar o super-precoce (AG 9010), figuras 2a e 2b, aos 45 DAE a ARN já se encontrava elevada, enquanto que para o cultivar P 3041(precoce), figuras 3a e 3b, a atividade estava baixa com elevação posterior, evidenciando que houve efeito de respostas entre os cultivares. PURCINO et al (1994), avaliaram milhos modernos e ditos “antigos” em dois níveis de adubação nitrogenada (20 e 60 kg ha⁻¹), encontraram variações da ARN entre os cultivares avaliados, no entanto, esses resultados não foram expresso em peso de grãos, concordando com resultados encontrados nesse trabalho. MACHADO et al.,(2001), trabalhando com dois cultivares de milho dito moderno e antigo, objetivando analisar a eficiência de absorção de nitrogênio (alto

e baixo conteúdo, 100 e 10 kg ha⁻¹, respectivamente), também não encontraram efeito na ARN, quando avaliado em campo experimental.

Tabela 1. Equações ajustadas da atividade da Redutase do Nitrato em dois cultivares de milho em função de épocas de adubação nitrogenada e presença ou não de molibdênio

Tratamentos*	AG9010		
Testemunha	$Y = 32,8082 - 1,4882X + 0,0222X^2 - 0,0001X^3$		$R^2 = 59$
T1	$Y = 39,9563 - 1,7748X + 0,0269X^2 - 0,00001X^3$		$R^2 = 79$
T2	$Y = 14,433 - 0,3354X + 0,0020X^2$		$R^2 = 83$
T3	$Y = 5,8631 - 0,0948X + 0,0004X^2$		$R^2 = 67$
T4	$Y = 6,13743 - 0,0979X + 0,000424X^2$		$R^2 = 91$
T5	$Y = 12,4242 - 0,2397X + 0,0012X^2$		$R^2 = 86$
T6	$Y = 19,5271 - 0,4708X + 0,0029X^2$		$R^2 = 74$
	P3041		
Testemunha	$Y = -5,3495 + 0,1877X - 0,014X^2$		$R^2 = 67$
T1	$Y = 36,7005 + 1,7327X - 0,0257X^2$		$R^2 = 94$
T2	Y = MÉDIA (0,42)		
T3	$Y = 1,4191 + 0,0627X - 0,0004X^2$		$R^2 = 65$
T4	$Y = 9,9379 + 0,3437X - 0,0025X^2$		$R^2 = 94$
T5	Y = MÉDIA(0,70)		
T6	$Y = 9,6375 + 0,3225X - 0,0023X^2$		$R^2 = 94$

*T1- N 15DAP –Mo, T2- N PL – Mo, T3- N 4^aF – Mo, T4- N 15DAP +Mo, T5- N PL + Mo e T6- N 4^aF + Mo e Testemunha – zero de N e Mo.

A atividade da glutamina sintetase (GS) variou entre $2,24 \pm 0,24$ a $3,55 \pm 0,11$, sendo que os resultados apresentaram o mesmo comportamento entre os tratamentos, independente do uso ou não da adubação com molibdênio (Figuras 4 e 5). Observa-se que a testemunha apresentou elevados valores aos 45 e 75 DAE; para o cultivar AG 9010 (figuras 4a e 4b), independente da aplicação do molibdênio. No entanto, para o cultivar P 3041, as melhores respostas da atividade da GS foram obtidas quando se aplicou N no plantio sem o adubação de Mo, seguido da testemunha (Figura 5a), nas avaliações realizadas aos 75 e 90 DAE; indicando que há uma variação entre os cultivares avaliados. Já na avaliação com a presença do molibdênio, nota-se que aos 60 e 75 DAE houve superioridade da atividade da GS para os tratamentos que receberam N em pré-semeadura (15DAP + Mo).

Quando a avaliação da GS foi realizada aos 90 DAE, observou-se a ocorrência de um comportamento semelhante entre todos os tratamentos para os dois cultivares avaliados, indicando que a época de aplicação do N pode interferir no comportamento inicial da atividade de GS, porém, ao final do ciclo vegetativo da cultura do milho ocorre estabilização da GS. No entanto, os resultados ressaltam que há uma superioridade da atividade enzimática

da GS para o cultivar P3041, para avaliações realizadas a partir do florescimento, indicando uma que há variação às respostas na atividade da GS e o ciclo vegetativo pode interferir nessa resposta.

Trabalhos desenvolvidos por MARTIN et al.(2005), mostraram efeito da absorção de nutrientes em milhos favorecido pelo maior período vegetativo na cultura do milho após o enchimento do grão, corroborando com resultados encontrado nesse trabalho. De acordo com a literatura, o aumento do período vegetativo é influenciado por genes que estendem o período de esverdeamento da planta mesmo após a ocorrência do enchimento de grão, denominado de *Stay-green*. Essa característica é uma prática que vem ganhando espaço nos programas de melhoramento. O aumento do período vegetativo favorece a atuação da atividade enzimática, entre elas o nitrato redutase e glutamina sintetase, conforme mostrado após o florescimento 60 DAE, neste trabalho.

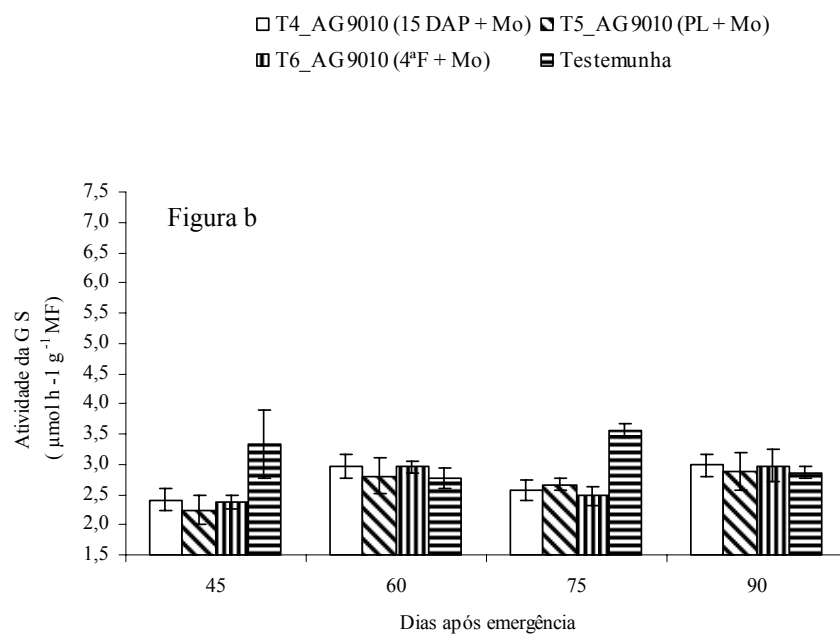
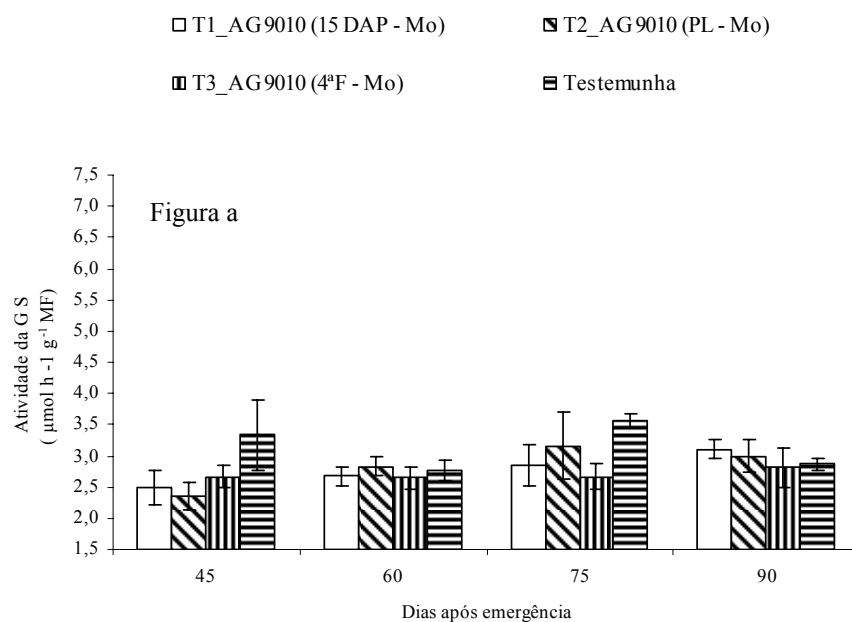


Figura 4. Atividade da enzima glutamina sintetase (GS), em cultivares de milho em Coimbra-MG, com adubação nitrogenada e molíbdica.

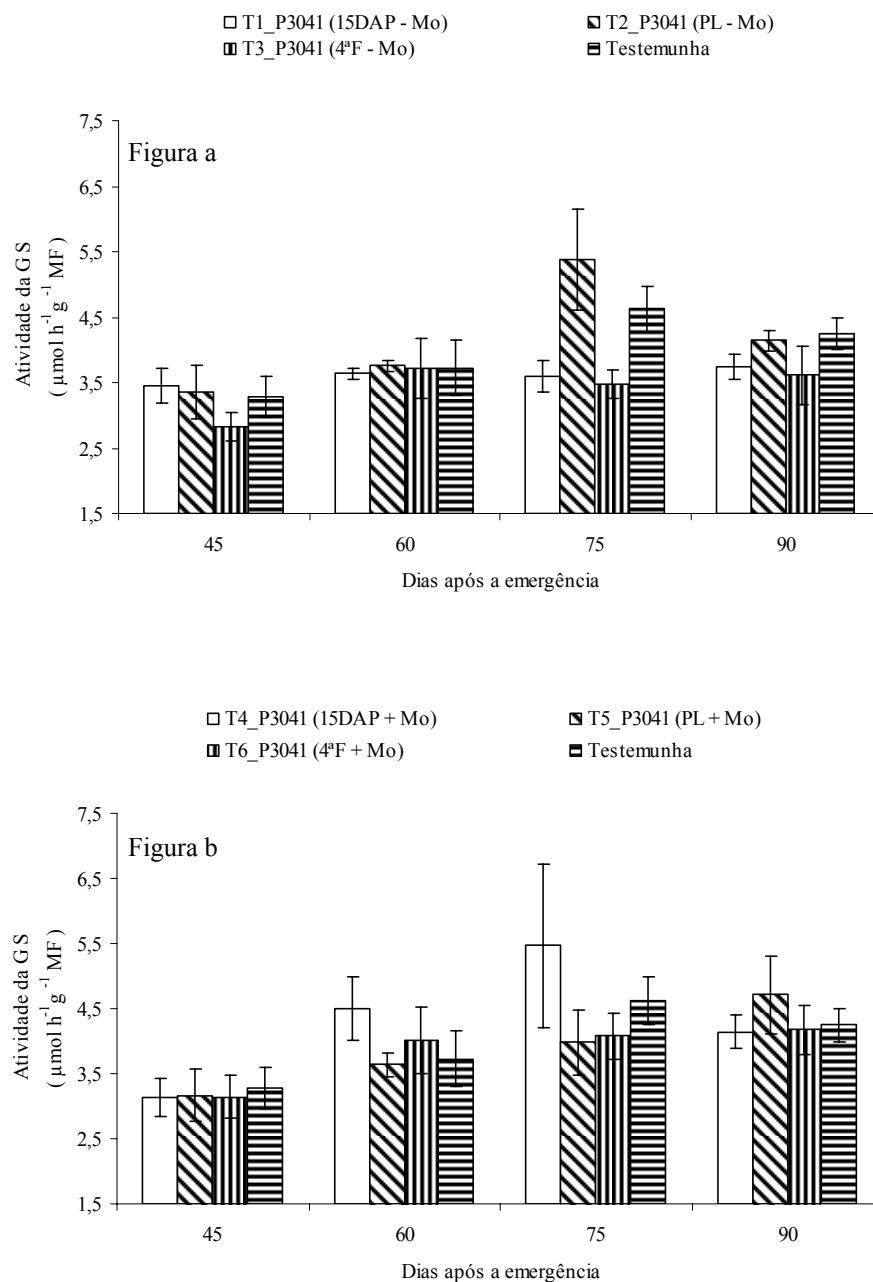


Figura 5. Atividade da enzima glutamina sintetase (GS), em cultivares de milho em Coimbra-MG, com adubação nitrogenada e molíbdica. Barras verticais: Intervalo de confiança.

A análise de N foliar, realizada nas diferentes épocas evidenciaram que somente aos 60 e 75 DAE, é que ocorreram uma diferenciação no teor de N foliar (Tabela 2), esta evidência é devido a forte relação fonte-dreno existente entre a alocação do particionamento das reservas foliares para o grão. No entanto, o teor de N é considerado baixo, pois, de acordo com FERREIRA et al. (2001), o teor de N foliar encontrado aos 45 DAE, necessário para garantir 90% da produção máxima de grãos é de 2,73 dag kg⁻¹. Para JONES Jr. et al., (1991),

esse valor é de 3,0 a 3,5 e de 2,70 a 4,0 dag kg⁻¹, respectivamente para 45 e 63 DAE. FERREIRA et al.,(2001), atribuiu essa variação do nível crítico de N às diferenças ambientais, as quais influenciam a absorção, translocação e acúmulo de nutrientes, síntese de fotoassimilados e a produção de grãos, fato esse que pode ter ocorrido nesse experimento.

Tabela 2. Teor de nitrogênio, avaliados aos 45, 60, 75 e 90 (dias após a emergência - DAE) em função das épocas de aplicações de nitrogênio em cultivares de milho na safra 2006/07 em Coimbra-MG

Épocas*	45	60	75	90
-----DAE-----				
1	2,08 a	1,47 a	1,27 a	0,89 a
2	1,98 a	1,08 ab	1,19 ab	0,81 a
3	1,89 a	0,96 b	0,82 b	0,75 a
CV (%)	14,18	50,77	45,15	28,33

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não difere estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

*1- Aplicação de N 15 dias antes do plantio, 2- Aplicação do N no plantio e 3 – cobertura com N na 4ª folha.

Nota-se que os menores valores no teor de nitrogênio foram obtidos quando o N foi aplicado em cobertura, época três. Apesar de o N ser aplicado na época que coincide com as usualmente utilizados pelos produtores, houve um baixo aproveitamento do N pela cultura do milho, possivelmente, devido às perdas do N por imobilização, lixiviação e volatilização. Além do mais, essa época de aplicação coincidiu com uma elevada precipitação e dias nublados reduzindo com isso a eficiência de absorção dos nutrientes pela cultura, concordando com encontrado na literatura (TAIZ & ZEIGER, 2004; EPSTEIN & BLOOM, 2006).

CONCLUSÕES

A época de aplicação do nitrogênio interfere na atividade enzimática independente da adubação com molibdênio.

A maior produtividade de grãos e maior atividade da redutase do nitrato foram obtidas com a aplicação de nitrogênio na época de que ao milho apresentou com quatro folhas completamente expandidas.

Os ciclos vegetativos dos cultivares de milho podem interferir na resposta da atividade enzimática.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e ao Departamento de Fitotecnia pelo espaço cedido para a realização do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, G. A. de A.; VIEIRA, C.; BERGER, P.G., GALVÃO, J.C.C. Épocas de aplicação de molibdênio na cultura do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21. Londrina, 1996. Anais... Londrina: IAPAR, 1996. p.160.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ÁLVARES, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B., NEVES, J. C. L. (Org.). Fertilidade do Solo. 1 ed. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007, v. 1, p. 375-470.
- COELHO, F. C. Efeito do nitrogênio e do Molibdênio sobre as culturas do milho e do feijão em monocultivos e em consórcio. Viçosa - MG: UFV, 1997. 132p. Tese de Doutorado em Fitotecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- DIOS, R. V.; BROYER, T. C. Deficiency symptoms and essentiality of molybdenum in corn hybrids. *Agrochimica*, Pisa, v.9, n.3, p.273, 1965.
- ELLIOTT, W. H. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 201:661-672, 1953.
- EPSTEIN, E. & BLOOM, A. J. Nutrição mineral de plantas, princípios e perspectivas. Trad. Maria Edna Tenório Nunes Londrina: Editora Planta, 401p, 2006.
- FERREIRA, A. C. de B.; ARAÚJO, G. A. A; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características Agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. *Scientia Agricola*, v.58, n.1, p.131-138, jan./mar. 2001.
- GALRÃO, E. Z. Efeito de micronutrientes e do cobalto na produção e composição química do arroz, milho e soja em solos de cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do solo*. V. 8, nº. 1, p. 111-116, 1984.
- JONES JR., J. B.; WOLF, B.; MILLS, H. A. *Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide*. Athens: Micro-Macro, 1991. 213p.
- KAWAKAMI, N. & WATANABE, A. Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNAs in radish cotyledons. *Plant Physiology*, Bethesda, 88: 1430-1434, 1988.
- LANA, Â. M. Q.; LANA, R M Q.; FRIGONI, A. S.; TREVISAN, L R. Doses, fontes e épocas de aplicação de micronutrientes na cultura do milho. *Magistra*, v. 19, p. 76-81, 2007.
- LEA, P. J. & AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. *Annals of Applied Biology*, v.151, 269–275, 2007.

- MACHADO, A. T.; SODEK, L. & FERNANDES, M. S. N-partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 2, p. 249-256, fev. 2001.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. London Academic Press Limited, 1995, 889p.
- MARTIN, A.; BELASTEGUI-MACADAM, X.; QUILLERÉ, I.; FLORIOT, M.; VALADIER, M.H.; POMMEL, B.; ANDRIEU, B.; DONNISON, I. & HIREL, B. Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytologist*, 167: 483–492, 2005.
- MIFLIN, B. J. & LEA, P. J. Ammonia assimilation. In: MIFLIN, B. J. (ed). *The biochemistry of plants: amino acids and derivatives*. New York: Academic, 1980, p.169-202.
- PAVINATO, P. S.; CERETTA, C. A.; GIROTTO, E.; MOREIRA, I. C. L. Nitrogênio e potássio em milho irrigado: análise técnica e econômica da fertilização. *Ciência Rural*, v. 38, p. 358-364, 2008.
- PEREIRA, S. L. Efeito da adubação nitrogenada e molibídica sobre a produtividade, teor de nitrogênio, atividade da redutase de nitrato e outras características da cultura do milho. Viçosa - MG: UFV, 1997. 89p. Tese de Doutorado em Fitotecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T.; MARRIEL, E. E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v.6, n.1, p.41-46, 1994.
- REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiologia Plantarum*, v.82, p.640-650, 1991.
- SAKAKIBARA, H., KAWABATA, S., TAKAHASHI, H., HASE, T. & SUGIYAMA, T. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-glutamate synthase in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues. *Plant & Cell Physiology*, Kyoto, 33:49-58, 1992.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2004.
- TEIXEIRA, A. R. Doses de molibdênio nas culturas do milho comum e milho-pipoca. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa – UFV, 2006.

ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO EM COBERTURA E MOLIBDÊNIO NA CULTURA DO MILHO EM PLANTIO DIRETO E ALOCAÇÃO DO NITROGÊNIO (^{15}N) NA PLANTA

RESUMO

Com o desenvolvimento de cultivares modernos, geralmente de porte baixo a médio, a produtividade do milho tem aumento e com conseqüência, a demanda por nitrogênio (N) segue a mesma tendência. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da época de aplicação de nitrogênio, na forma de uréia enriquecida com ^{15}N , sobre a produtividade de grãos e sua distribuição nos componentes da planta de milho, na presença e ausência de adubação de molibdênio, em sistema de plantio direto. O experimento foi conduzido no ano agrícola de 2006/07, na Estação Experimental de Coimbra. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com três repetições, no esquema fatorial $3 \times 2 + 1$, três épocas de aplicação de N, na ausência e na presença de adubação com molibdênio (Mo), e uma testemunha sem fertilização. Os tratamentos consistiram de: **T1**- aplicação total de nitrogênio 15 dias antes do plantio, sem molibdênio; **T2**- aplicação total de nitrogênio no plantio, sem molibdênio; **T3**- aplicação total de nitrogênio na época em que o milho se encontrava com quatro folhas completamente desenvolvida sem molibdênio; **T4**- aplicação total de nitrogênio 15 dias antes do plantio, com molibdênio; **T5**- aplicação total de nitrogênio no plantio, com molibdênio; **T6**- aplicação total de nitrogênio na época em que o milho se encontrava com quatro folhas completamente desenvolvida com molibdênio **T7**- testemunha sem nitrogênio e sem aplicação de Mo. O cultivar utilizado foi o híbrido simples AG 9010. O melhor suprimento de N ao longo do ciclo e a maior produtividade foram obtidos com a aplicação do fertilizante no estágio de quatro folhas expandidas do milho. Não foi encontrado efeito da adubação molíbdica sobre as características avaliadas. A aplicação do N na pré-semeadura do milho, 15 dias antes do plantio, demonstrou não ser recomendável para as condições de solo e clima estudadas. A parte da planta do milho de maior alocação de N foi o grão. A recuperação média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante foi de 6 %. A quantidade média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante foi de $9,21 \text{ kg ha}^{-1}$, mas quando da aplicação da Uréia no estágio de quatro folhas a recuperação chega ao redor de 16%. A matéria orgânica do solo é a principal fonte de N para as plantas de milho.

Palavras chaves: adubação nitrogenada, cobertura, uréia, ^{15}N , *Zea mays*.

TIMES OF APPLICATION OF NITROGEN IN COVERING AND MOLYBDENUM IN THE CORN CROP IN DIRECT PLANTING AND ALLOCATION OF THE NITROGEN (^{15}N) IN THE PLANT

SUMMARY

With the development of modern cultivars, usually for small to medium size, the productivity of the corn has increase and with consequence, the demand for nitrogen (N) follows the same tendency. This work had as objective evaluates the effect of the time of application of nitrogen, in the urea form enriched with ^{15}N , on the productivity of grains and its distribution in the components of the corn plant, in the presence and absence of molybdenum manuring, in system of direct planting. The experiment was conducted in the agricultural year of 2006/07, in the Experimental Station of Coimbra. The experimental design was randomized blocks, with three repetitions, in factorial schedule $3 \times 2 + 1$, three times of N application, in the absence and in the manuring presence with molybdenum (Mo), and a testify without fertilization. The treatments consisted of: T1 - total application of nitrogen 15 days before the planting, without molybdenum; T2 - total application of nitrogen in the planting, without molybdenum; T3 - total application of nitrogen at time the corn had four leaves completely developed without molybdenum; T4 - total application of nitrogen 15 days before the planting, with molybdenum; T5 - total application of nitrogen in the planting, with molybdenum; T6 - total application of nitrogen at time the corn had four leaves completely developed with molybdenum T7 - testifies without nitrogen and without application of Mo. The simple hybrid AG 9010 cultivar was used. The best supply of N during the cycle and the largest productivity was obtained with the application of the fertilizer in the stadium of four expanded leaves of the corn. It was not found effect of the fertilization with molybdenum on the appraised characteristics. The application of N in the pre planting of corn, 15 days before the planting, demonstrated not to be advisable for the soil conditions and climate studied. The part of the corn plant with larger allocation of N was the grain. The mean recovery of nitrogen in the plant originating from the fertilizer was 6%. The medium amount of nitrogen in the plant originating from the fertilizer was of $9,21 \text{ kg ha}^{-1}$, but when urea was applied to the stadium of four leaves the recovery arrives around 16%. The organic matter of the soil is the main source of N for the plants

Key words: Nitrogen fertilizer, covering, urea, ^{15}N , *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

A aplicação adequada de nutrientes no solo é fator importante que interfere no rendimento da cultura, na atividade dos microrganismos e na melhoria da qualidade do solo. O nitrogênio é um dos nutrientes absorvido em maior quantidade pela cultura do milho. Porém é sabido que a recuperação do nitrogênio dos fertilizantes nitrogenados, pelas plantas, é relativamente baixa, alcançando em muitos casos menos que 50 % (RAO et al., 1992). COELHO et al., (1991) utilizou 60 kg ha⁻¹ de N, obtiveram recuperação de 60 % do nitrogênio aplicado como uréia na cultura do milho. No entanto, quando as doses de N são maiores, a recuperação do N tende a diminuir, como observado por MELGAR et al., (1991) e GROVE et al., (1980), que obtiveram 36 % e 40 % de recuperação do N, aplicado na cultura do milho, na forma de uréia, nas doses de 120 e 140 kg ha⁻¹ de N, respectivamente.

A baixa eficiência de recuperação do N do fertilizante tem sido atribuída, principalmente, às perdas gasosas do N (volatilização e desnitrificação). As perdas do fertilizante nitrogenado por desnitrificação têm sido estimadas em menos de 10% na cultura do milho (HILTON et al., 1994), porém, a perda de N-NH₃ por volatilização, quando a uréia, não é enterrada ou incorporada ao perfil do solo pela água da chuva ou de irrigação, pode atingir de 31 % a 78 % do total de N aplicado (LARA CABEZAS et al., 1997 e VILLAS BÔAS et al., 2005).

Em outro estudo de LARA CABEZAS et al., (2005), em que foram aplicados as fontes sulfato de amônio (SA) e uréia (U) marcados com ¹⁵N na cultura do milho, em sucessão à aveia preta (*Avena strigosa* Schieb.), no sistema plantio direto, aplicando-se o N aos 43 dias antes e 31 dias depois da semeadura, na dose de 80 kg ha⁻¹ de N e incorporados de 5–7 cm de profundidade nas entrelinhas do milho. Os autores encontraram que o N-SA, apresentou maior assimilação pelo milho devido à maior rapidez de reciclagem do N imobilizado-mineralizado. Na adubação em cobertura no milho, no sulco de adubação, somente ocorreu imobilização do N-U, retardando a sua assimilação pela planta, em relação ao N-SA. Para cada kg de N fertilizante imobilizado no sulco de adubação,

independentemente da época de aplicação e das fontes, a maior quantidade de N-SA foi recuperada pela planta entre os estádios de 11–12 folhas e florescimento.

SILVA et al., (2006) avaliaram a aplicação do ^{15}N em uma leguminosa (*Crotalaria juncea*) e numa gramínea - milho (*Pennisetum americanum*) sob plantio direto em Latossolo Vermelho de Cerrado, com posterior plantio do milho. Esses autores observaram que o nitrogênio inorgânico promoveu efeito sinérgico na quantidade de N absorvida e no aproveitamento pelo milho do N da crotalaria e do milho.

As práticas de manejo do solo, as condições climáticas, a época de aplicação do N e as características do solo são responsáveis pela dinâmica do N. Nesse contexto, COSTA et al., (2004) avaliaram as perdas de N, na forma de amônia, provenientes da aplicação da uréia em três solos argilosos, submetidos a diferentes regimes de umidade e com diferentes características químicas e mineralógicas. Os autores observaram que os solos apresentaram diferenças quanto às perdas de N proveniente da amônia em função da umidade inicial e da composição mineralógica da fração argila; para condições de solos saturados essa característica não foi influenciada.

Sabe-se da grande importância do molibdênio para a impulsão da atividade enzimática. Portanto, qualquer deficiência do elemento pode comprometer o metabolismo do N e visto que o micronutriente é componente da enzima redutase do nitrato, responsável pela redução do nitrato absorvido para nitrito e posteriormente a NH_3 pela atuação do ciclo GS/GOGAT ou asparagina sintetase (AS) (TAIZ E ZEIGER, 2004), interferindo diretamente no crescimento e desenvolvimento do milho e, conseqüentemente, na produção de grãos. A faixa crítica de concentração de Mo em folhas de milho é de 0,1 a 0,2 mg kg⁻¹ (DIOS E BROYER, 1965). COELHO (1997) e FERREIRA (2001), em estudos realizados na Zona da Mata de Minas Gerais, obtiveram incrementos de produtividade do milho com a adubação molíbdica utilizando doses crescentes de molibdênio e associações com doses de N. Diante disso, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da época de aplicação de nitrogênio, na forma de uréia enriquecida com ^{15}N , sobre a produtividade de grãos e sua distribuição na planta de milho, na presença e ausência de adubação de molibdênio, em sistema de plantio direto.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no ano agrícola 2006/07, na Estação Experimental de Coimbra pertencente à Universidade Federal de Viçosa, situada no município de Coimbra, na Zona da Mata de Minas Gerais, caracterizada pelas coordenadas geográficas 20° 50' 30'' de latitude Sul e 42° 48' 30'' de longitude Oeste, altitude de 715 metros, em solo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, fase terraço. Na camada de zero a 10 cm o solo apresentou as seguintes características: 70 % de argila; pH em água de 5,5; 19,4 mg/ dm³ de P (Mehlich 1); 135,0 mg/ dm³ de K; 0,1 cmol_c/dm³ de Al; 1,6 cmol_c/dm³ de Ca; 0,7 cmol_c/dm³ de Mg e 2,1 dag/kg de MO.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com três repetições, no esquema fatorial 3 x 2 + 1, três épocas de aplicação de N, na ausência e na presença de adubação com molibdênio (Mo), e uma testemunha sem fertilização. Os tratamentos consistiram de: **T1**- aplicação total de nitrogênio 15 dias antes do plantio, sem molibdênio; **T2**- aplicação total de nitrogênio no plantio, sem molibdênio; **T3** - aplicação total de nitrogênio na época em que o milho se encontrava com quatro folhas completamente desenvolvida sem molibdênio; **T4**- aplicação total de nitrogênio 15 dias antes do plantio, com molibdênio; **T5**- aplicação total de nitrogênio no plantio, com molibdênio; **T6** - aplicação total de nitrogênio na época em que o milho se encontrava com quatro folhas completamente desenvolvida com molibdênio **T7** - testemunha sem nitrogênio e sem aplicação de Mo. O cultivar utilizado foi o híbrido simples AG 9010. O plantio foi realizado manualmente em novembro (30/11/2006), sobre palhada de aveia em sistema de plantio direto. Após o desbaste, manteve-se uma população de 50.000 plantas ha⁻¹. A parcela experimental foi composta por oito linhas de 5,0 metros de comprimento com espaçamento de 0,50 m entre as linhas de plantio. A área útil de cada parcela era de 12 m².

A adubação de plantio foi realizada com 380 kg ha⁻¹ da formulação 8 - 28 - 16 (N-P₂O₅-K₂O) para as parcelas que receberam N em cobertura e para as parcelas que não receberam N adubou-se com 106 kg de P₂O₅, na forma de Superfosfato Simples e 60 kg de K₂O, como Cloreto de Potássio. A adubação de cobertura com N foi realizada com uréia, utilizando 150 kg ha⁻¹, enriquecida com 5 % de átomos em excesso (¹⁵N), sendo que a uréia foi aplicada na subparcela numa microparcela de 2 X 2 m locada dentro a área útil da parcela, sem

incorporação. O Mo (90 g ha^{-1}) foi aplicado como molibdato de sódio por via foliar, aos 25 dias após a emergência (DAE), de acordo com PEREIRA, (1997) nos respectivos tratamentos.

As plantas daninhas foram controladas através de capinas químicas utilizando o herbicida proveniente da mistura atrazine + nicosulfuron (Siptran ($3,0 \text{ l/ha}$) e Sanson (300 ml/ha)), respectivamente. Não houve necessidade de realizar o controle de insetos-pragas.

Foram realizadas amostragens das plantas aos 45, 60, 75, 90 (DAE) e também por ocasião da colheita, quando se coletaram duas plantas inteiras por microparcela, as quais foram particionadas em colmo, folhas, pendão, espiga (grãos, sabugo e palha). Após esta etapa as amostras foram secas em estufa (65° C por duração de 72 horas) com circulação de ar forçada e então, moída em moinho tipo Wiley, sendo posteriormente remoídas em moinhos de bola, para obtenção de granulometria menor que 100 mesh. As amostras de tecido vegetal foram analisadas para N total e abundância de ^{15}N em espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo (ANCA-GSL 20-20. Sercon, Crewe, UK). A abundância de ^{15}N foi expressa em relação ao N atmosférico (Delta air em partes por milhão - ‰). Os teores de N (dag kg^{-1}) acumulado (kg ha^{-1}) em cada compartimento da planta tomando como base a produção de matéria seca. A percentagem de N nesses diferentes compartimentos, proveniente do fertilizante (% NPPF), foi calculado conforme a equação (OLIVEIRA et al., 2003): $\% \text{NPPF} = [(a-c)/(b-c)] \times 100$ em que,

a = abundância de ^{15}N em ‰ de átomos no tecido de cada compartimento, b = 5 ‰, enriquecimento da uréia em ^{15}N e, c = abundância de ^{15}N natural no tecido da planta (mensurada na testemunha);

A quantidade de nitrogênio do grão, proveniente do fertilizante (QNPPF), conforme a equação (OLIVEIRA et al., 2003): $\text{QNPPF} (\text{kg ha}^{-1}) = [\% \text{NPPF}/100] \times \text{Np}$ em que $\text{Np} = \text{N acumulado em cada compartimento em } (\text{kg ha}^{-1})$;

A avaliação de produtividade e dos componentes de produção (kg ha^{-1}) foram realizadas com o peso total de grãos da parcela (12 m^2) e extrapou os resultados para a produtividade de um hectare, corrigiu a umidade para 13 %.

Os dados foram submetidos à análise de variância, comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % e para as características quantitativas utilizou-se análise de regressão. Médias de precipitação e temperatura medidas na estação experimental de Coimbra, por decêndio, estão representadas na Figura 1.

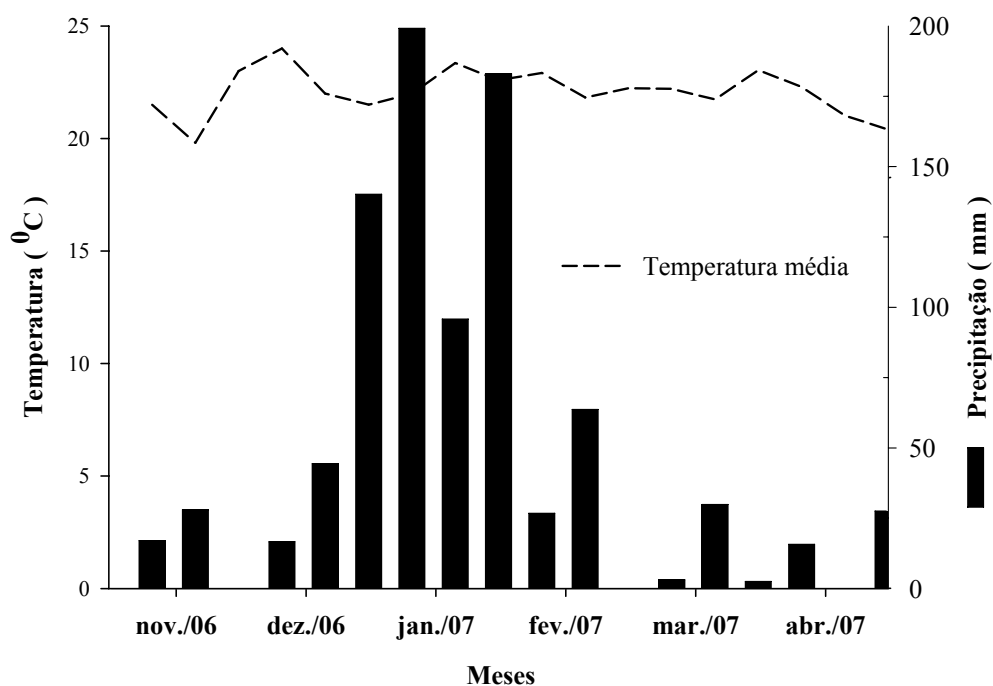


Figura 01 - Precipitação (mm) e temperatura média em decêndio (° C), observadas durante a condução do experimento em 2006/07.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A recuperação do ^{15}N do fertilizante nas folhas, no colmo, no pendão, na palha de espiga e no sabugo não diferiu entre os tratamentos. Já para a produção de grãos e quantidade de nitrogênio total na planta proveniente do fertilizante (QNPPF) houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1). Em média, 62 % da massa seca total da planta alocaram-se nos grãos, restando 28 % para as demais partes da planta. O tratamento 6 (N aplicado na época que o milho se encontrava com quatro folhas completamente desenvolvida), foi superior ao demais, mas, no entanto, diferiu significativamente somente do tratamento 4 para o peso de matéria seca de grãos. Apesar de não existir diferença entre as demais características avaliadas, observa-se uma tendência das melhores respostas para a adubação nitrogenada realizada quando o milho apresentava-se com quatro folhas desenvolvida.

A quantidade média de ^{15}N na planta proveniente do fertilizante (QNPPF) foi de 9,21 kg ha⁻¹ representando cerca de 6 % do total de N acumulado na parte aérea do milho. As

maiores quantidades de ^{15}N provenientes de fertilizantes foram 15,70 e 16,20 kg ha^{-1} , respectivamente para os tratamentos que receberam N na época que o milho se encontrava com quatro folhas expandidas, resultados que coincide com a maior produtividade (Tabela 1). FERNANDES & LIBARDI (2007), também encontraram valores baixos de recuperação de N do fertilizante na parte aérea do milho e associaram essas prováveis perdas (lixiviação, denitrificação e volatilização) às causas climáticas ocorridas e a permanência desse N no solo. Infere-se, portanto, que o potencial de mineralização do N-orgânico do solo constitui-se em uma importante fonte de N para a planta, conforme descrito por SAMPAIO et al. (1995); muitas vezes, esse nitrogênio orgânico contido no solo exerce grande influência sobre os valores de NPPF obtidos em campo (LIANG E MACKENZIE, 1994).

Tabela 1. Massa de material seco do grão, da folha, do colmo, do pendão, da palha de espiga e do sabugo em kg ha^{-1} e aproveitamento de N em toda a planta de milho (kg ha^{-1}), em Coimbra-MG

Molibdênio	Nitrogênio	Grãos	Folha	Colmo	Pendão	P. Espiga	Sabugo	MS total	QNPPF
kg ha^{-1}									
- Mo	N 15 DAP	3740,3 ab	760,2 a	1259,0 a	74,3 a	780,1 a	666,7 a	7387,6 a	6,1 bc
	N Plantio	4625,9 ab	1292,8 a	1152,2 a	53,4 a	642,2 a	677,7 a	7727,4 a	8,3 b
	N 4ª Folha	4434,6 ab	833,7 a	998,3 a	66,7 a	726,9 a	657,8 a	7831,1 a	15,7 a
+ Mo	N 15 DAP	2810,7 b	991,8 a	1038,1 a	52,7 a	955,9 a	687,2 a	7177,9 a	3,5 c
	N Plantio	3864,2 ab	880,1 a	1065,6 a	45,8 a	609,7 a	470,0 a	7029,9 a	5,4 bc
	N 4ª Folha	5524,09 a	654,2 a	994,7 a	42,3 a	663,2 a	640,7 a	7583,8 a	16,2 a
CV (%)		18,07	35,58	20,54	45,39	50,98	51,15	17,57	19,55

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os tratamentos influenciaram os componentes de produção estudados. A adubação nitrogenada aumentou a produtividade do milho de 887 kg ha^{-1} para uma média de 3762 kg ha^{-1} , um incremento de 424 % (Tabela 1). Não houve, no entanto, efeito significativo da aplicação de molibdênio (Mo).

O tratamento três (N na 4ª folha, sem Mo) elevou o peso de 1000 grãos em 16 % e o peso de espiga em 388 % e a produtividade de grãos em 417 % em relação ao tratamento sem aplicação de N (Testemunha). Possivelmente, a eficiência de absorção do N através da raízes do milho foi um dos fatores responsáveis por esse comportamento, expressando uma elevada atividade metabólica e, conseqüentemente, maior teor de N nas folhas (Figura 2). Outro fator que pode estar contribuindo com esse resultado pode ser devido a maior duração do período vegetativo pela característica *stay green* do cultivar. De acordo com SANGOI et al., (2007a) a

maior eficiência dos híbridos modernos e tolerantes ao adensamento em converter a fitomassa acumulada na floração em produção de grãos pode estar relacionada com a senescência foliar mais lenta na fase reprodutiva.

Ao se analisar o efeito das épocas de aplicação do N (Tabela 2) confirma-se a superioridade dos componentes de produção e da produtividade quando se realizou o parcelamento do N na 4ª folha. A produtividade do milho na safra 2006/2007, neste estudo, foi relativamente baixa, quando comparada com o potencial produtivo de grãos da região. Isso provavelmente decorreu do excesso de chuvas, de baixa intensidade luminosa nos meses de dezembro de 2006 a meados de fevereiro de 2007, quando se observou precipitação acumulada de mais de 700 mm (Figura 1). O clima adverso (excessivamente chuvoso), combinado com a topografia plana e infiltração lenta, típica de Argissolo, contribuem para excesso de umidade e elevada heterogeneidade das plantas, resultando em coeficientes de variação elevados (Tabela 2).

A época de aplicação da adubação nitrogenada influenciou no peso da massa de mil grãos entre os tratamentos, indicando que a alocação de N contribuiu para aumentar o número de grãos e tamanho da espiga (Tabela 2). A melhor resposta para os peso de espigas e de grão foi na adubação nitrogenada aplicada no estágio de quatro folhas do milho com aproximadamente 1000 kg ha⁻¹ a mais que nas demais épocas, porém não diferindo significativamente da aplicação de N no plantio (Tabela 2). A aplicação de N na pré-semeadura reduziu o peso de grãos em 17 % em relação à adubação no estágio de quatro folhas e em 6 % comparado com a aplicação de N no plantio. GOMES et al. (2007) não encontraram resposta no peso de grãos em resposta às épocas de aplicação de N, porém encontraram resposta ao peso de mil grãos. Já SILVA et al., (2005) avaliando o efeito da época de aplicação de N-uréia em duas formas de aplicações (superfície e incorporado), na região de Cerrado, observaram que o N incorporado na semeadura e N aplicado (120 kg ha⁻¹) aos 15 dias após a emergência das plântulas foram os tratamentos que promoveram maior rendimento de grãos.

Tabela 2. Peso de mil grãos (P 1000), peso de espiga (PE) e produtividade (PG) em função dos tratamentos e da época de aplicação de nitrogênio, Coimbra-MG

Molibdênio	Nitrogênio	P 1000	PE	PG
		g	kg ha ⁻¹	
- Mo	N 15 DAP	239 ab	4521 a	3740a
	N Plantio	236 ab	4412 a	3625a
	N 4ª Folha	263 a	5821 a	4434 a
+ Mo	N 15 DAP	232 ab	3956 ab	2810 ab
	N Plantio	252 ab	4492 a	3864 a
	N 4ª Folha	247 ab	5547 a	5524 a
Testemunha (- N e - Mo)		225 b	1192 b	887 b
Épocas de aplicação do N				
	N 15 DAP	235 a	4238 b	3297 b
	N Plantio	244 a	4452 b	3503 ab
	N 4ª Folha	255 a	5658 a	4486 a
CV (%)		6,42	30,13	31,14

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Não se observou diferenças no teor de N das plantas devido as épocas de aplicações nos tratamentos sem Mo (Figura 2) aos 45 dias após a emergência (DAE). Na época do florescimento do milho, próximo dos 60 DAE, observou-se que o tratamento testemunha, foi que expressou menor conteúdo de N em relação aos demais tratamentos ($1,67 \text{ dag kg}^{-1} \pm 0,14$), sendo que quando o N foi aplicado no momento que a planta apresentava quatro folhas completamente expandidas (T3) atingiu o maior conteúdo de N ($2,73 \text{ dag kg}^{-1} \pm 0,02$). Após 75 DAE, observou-se redução nos teores de N: T3>T2>T1>testemunha. Esse comportamento pode ser explicado pela própria época de aplicação de N no solo, a aplicação de N na época que o milho se encontrava com quatro folhas expandidas houve favorecimento do N no solo, devida a aplicação tardiamente e também maior aproveitamento do N promovido pela maior exploração das raízes de milho ao solo. Quando a adubação nitrogenada foi acompanhada de adubação molíbdica, observou-se comportamento semelhante à ausência de Mo até aos 75 dias (75 DAE). Após esse período observou-se efeito inverso com tendência de aumento nos teores de N. Pode se inferir que a adubação nitrogenada associada ao Mo influenciou no metabolismo da planta, acelerando a transformação do N em fotoassimilados, quando se adubou na 4ª folha completamente desenvolvida do milho. Esse efeito pode ser influenciado pela maior eficiência de absorção e translocação de N pelos transportadores, conforme observado por LEA & AZEVEDO (2007). O molibdênio interfere diretamente no crescimento e desenvolvimento do milho e, conseqüentemente, na produção de grãos, por meio do metabolismo do N, visto que o micronutriente é componente da enzima redutase do

nitrato, responsável pela redução do nitrato absorvido para nitrito e, posteriormente, a NH_3 (TAIZ E ZEIGER, 2004).

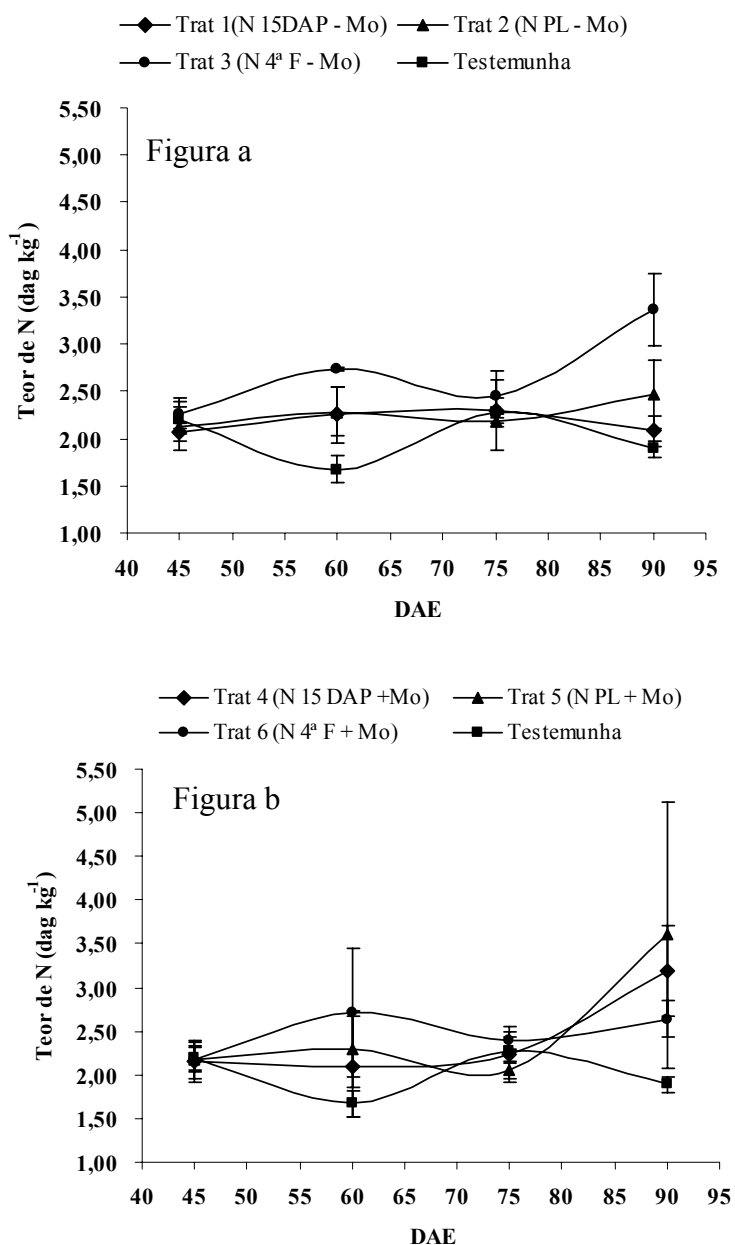


Figura 2. Teor de nitrogênio na folha de milho em função das épocas de aplicação de N e no suprimento de Mo na cultura do milho. Barras verticais: Intervalo de confiança.

Outro fator que pode ter influenciado este comportamento é a característica genética que dá a planta de milho maior período vegetativo mesmo após a maturação fisiológica dos

frutos, denominado de *stay green*, favorecendo a planta maior reserva energética (SILVA et al., 2008, SILVA, 1999; DUVICK (1992) e RUSSEL (1986). Segundo GONG et al., (2005) o comportamento da manifestação fenotípica em genótipos *stay-green* revela um prolongamento na duração da área verde dos colmos e das folhas, determinando que a fase de senescência se estenda e inicie de cima para baixo na planta; os colmos e as folhas são as últimas estruturas a secar, possibilitando que os fotoassimilados dessas estruturas estejam disponíveis para translocação durante toda a fase de enchimento dos grãos.

Apenas o teor de N no grão diferiu estatisticamente em relação à época de aplicação do N (Tabela 3). Houve superioridade no conteúdo de N quando este foi aplicado sobre a palhada de aveia-preta quinze dias antes do plantio (Época 1). No entanto, esse resultado diferiu somente da aplicação de N no plantio. Para as demais características avaliadas, não foram encontradas variações entre as médias, mesmo assim, observou-se uma distribuição equilibrada do conteúdo de N em todas as partes da planta, independente da época de aplicação de nitrogênio na superfície do solo. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por GAVA et al. (2006). Essa distribuição equidistante no conteúdo de N é devido à rápida absorção de nitrogênio pelas raízes e também devido a sua mobilidade interna (TAIZ E ZEIGER, 2004). Apesar de não haver diferenças estatísticas entre as características avaliadas para os tratamentos, o maior conteúdo de nitrogênio se encontrou na parte de interesse, o grão.

No sistema plantio direto, a antecipação da adubação nitrogenada (pré-semeadura) é uma prática que dependendo do tipo de solo, pode ter respostas positivas a aplicação de N mineral para o cultivo de milho (SANGOI et al., 2007b). LARA CABEZAS et al., (1997), relataram que a aplicação de N antecipada na região dos cerrados representa uma prática de risco, em razão da ocorrência de chuvas de alta intensidade, acarretando a perda do referido nutriente por lixiviação e volatilização e, conseqüentemente, perda de produtividade, conforme foi observado também por SILVA et al.(2005). Esse fato pode ter acontecido em nesse experimento, apesar de ser um solo bastante argiloso, a elevada intensidade e volume de chuvas durante a condução do experimento (Figura 1), pode ter influenciado tal resposta. Entretanto, a aplicação em pré-semeadura certamente promoveu acréscimos no teor de N no solo e na absorção pelas plantas de milho após o manejo da cultura de cobertura, podendo também ter influenciado a taxa de decomposição dos resíduos vegetais, corroborando com os resultados encontrados por BASSO & CERETTA (2000).

Na literatura brasileira, há poucos trabalhos relativos à aplicação do molibdênio na cultura do milho e, na maioria deles, não foi verificada melhoria do crescimento ou da produção de grãos, dados que corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho. O pequeno efeito da adubação molíbdica pode ser atribuído a vários fatores: teores de Mo na semente e/ou no solo próximo aos ideais para o milho; alta adubação fosfatada utilizada como adubação básica, a qual pode ter propiciado aumento da disponibilidade desse micronutriente no solo; e também aplicação tardia do Mo, uma vez que, neste estudo, ele foi aplicado por meio de pulverização foliar aos 25 DAE, corroborando com resultados encontrados por PEREIRA et al. (1999). Entretanto, ARAÚJO et al. (1996) obtiveram incremento de 14,3 % na produtividade de grãos de milho com aplicação de 90 g ha⁻¹ de Mo e COELHO (1997), observou aumento de 39,5 % na produção de grãos do milho (AG 302A), com a adubação de 50 g ha⁻¹ de Mo, no município de Coimbra-MG, aplicado em cobertura em pulverização foliar aos 15 DAE.

Tabela 3. Teor de nitrogênio (dag kg⁻¹) na colheita para as características: folha (NF), no colmo (N Col), no grão (N Grão), na palha do milho (N Palha), no sabugo (N Sab), no pendão (N Pend), e na raiz de milho (N Raiz), em função dos tratamentos, e em função da época de aplicação de nitrogênio, em Coimbra – MG

Molibdênio	Nitrogênio	NF	N Col	N Grão	N Palha	N Sab	N Pend	N Raiz
		dag kg ⁻¹						
- Mo	N 15 DAP	1,63 a	1,34 a	2,01 a	1,28 a	1,14 a	1,51 a	1,48 a
	N Plantio	1,55 a	1,53 a	1,85 a	1,32 a	1,27 a	1,42 a	1,45 a
	N 4ª Folha	1,51 a	1,24 a	1,92 a	1,21 a	1,30 a	1,47 a	1,56 a
+ Mo	N 15 DAP	1,47 a	1,26 a	1,91 a	1,26 a	1,21 a	1,58 a	1,62 a
	N Plantio	1,53 a	1,27 a	1,77 a	1,19 a	1,21 a	1,53 a	1,55 a
	N 4ª Folha	1,54 a	1,27 a	1,77 a	1,22 a	1,22 a	1,49 a	1,68 a
Testemunha (- N e - Mo)		1,55 a	1,34 a	1,93 a	1,18 a	1,29 a	1,54 a	1,58 a
Épocas de aplicação do N								
	N 15 DAP	1,55 a	1,30 a	1,96 a	1,27 a	1,18 a	1,54 a	1,55 a
	N Plantio	1,54 a	1,31 a	1,81 b	1,25 a	1,24 a	1,47 a	1,50 a
	N 4ª Folha	1,52 a	1,25 a	1,84 ab	1,21 a	1,26 a	1,48 a	1,62 a
CV (%)		6,59	4,07	6,36	5,15	6,93	4,81	7,29

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Ao analisar a abundância de nitrogênio marcado (¹⁵N), observou-se que a adubação nitrogenada elevou os patamares de N na folha, independente da época de aplicação de N e da adubação ou não com Mo, quando comparado com o tratamento testemunha (Figura 3). Quando se aplicou N 15 DAP e no ato do plantio, o pico máximo de N derivado fertilizante coincidiu com a época de florescimento, decrescendo na fase de enchimento de grãos e

maturação fisiológica. Já na aplicação na 4ª folha, houve maior contribuição do ^{15}N do fertilizante ao longo do ciclo da cultura, até mesmo na fase de enchimento de grãos. Essa maior disponibilidade de N, certamente favoreceu a maior produtividade do milho (Tabela 2). Observou-se comportamento semelhante para ^{15}N foliar derivado do fertilizante, com superioridade dos tratamentos 3 e 6 (aplicação no estágio de 4ª folha). Portanto, ficou evidente que a aplicação de N no estágio de 4ª folha favorece sua absorção e sua translocação para o grão. Os valores de abundância de ^{15}N variaram entre $17,81 \pm 4,34$ (Testemunha) a $400,85 \pm 351,59$ para os tratamentos sem aplicação de Mo, e de $17,81 \pm 4,34$ (Testemunha) a $455,77 \pm 201,57$ para as adubações nitrogenadas acompanhada do Mo.

Tomando como base a produção de matéria seca, os teores de N e a abundância de ^{15}N , em cada compartimento da planta, foram calculados os percentuais do N da planta derivado do fertilizante (NPPF %) (Tabelas 3 e 4). Houve variação no aproveitamento de ^{15}N do fertilizante entre 5,9 (45 DAE - T1) a 64,4 (60 DAE – T3) com médias de 10,0; 11,9 e 31,0, respectivamente, para os tratamentos T1, T2 e T3 (sem Mo). Para os tratamentos T4, T5 e T6 (com Mo) suas respectivas médias foram: 6,5; 11,8; e 27,9. Por outro lado, quando se avaliou o NPPF (%) em relação às épocas de aplicação de N, as médias dos resultados foram: 8,2 %, quando o N foi aplicado na pré-semeadura (época 1), de 11,8 % quando o N foi aplicado no plantio (época 2), 29,5 % quando o N foi aplicado no momento que o milho se encontrava com quatro folhas expandidas (época 3).

O baixo aproveitamento do N pelas plantas pode ter sido influenciado diretamente pelo excesso de chuvas que ocorreu durante o período de avaliação (Figura 1), além do mais, a condição de baixa luminosidade pode ser outro fator que contribuiu para esses resultados (TAIZ E ZEIGER, 2004), acarretando a baixa produção de grãos, conforme descrito anteriormente (Tabela 1).

LARA-CABEZA & COUTO (2007), estudando o efeito de imobilização de N das fontes Uréia e Sulfato de Amônio, observaram que houve tendência de diminuição do N total do solo no sulco de adubação em ambas as fontes, como consequência da provável mineralização de N-MO (Matéria Orgânica), absorção pela planta, e do deslocamento do N fertilizante para a subsuperfície. Os resultados deste experimento e os da literatura evidenciam que o maior dreno de N na planta localiza-se no grão e que grande quantidade do N das partes vegetativas da planta, é translocado até o grão, onde é acumulado, fazendo parte

de aminoácidos e proteínas na sua formação, corroborando com resultados encontrados por (GAVA et al., 2006).

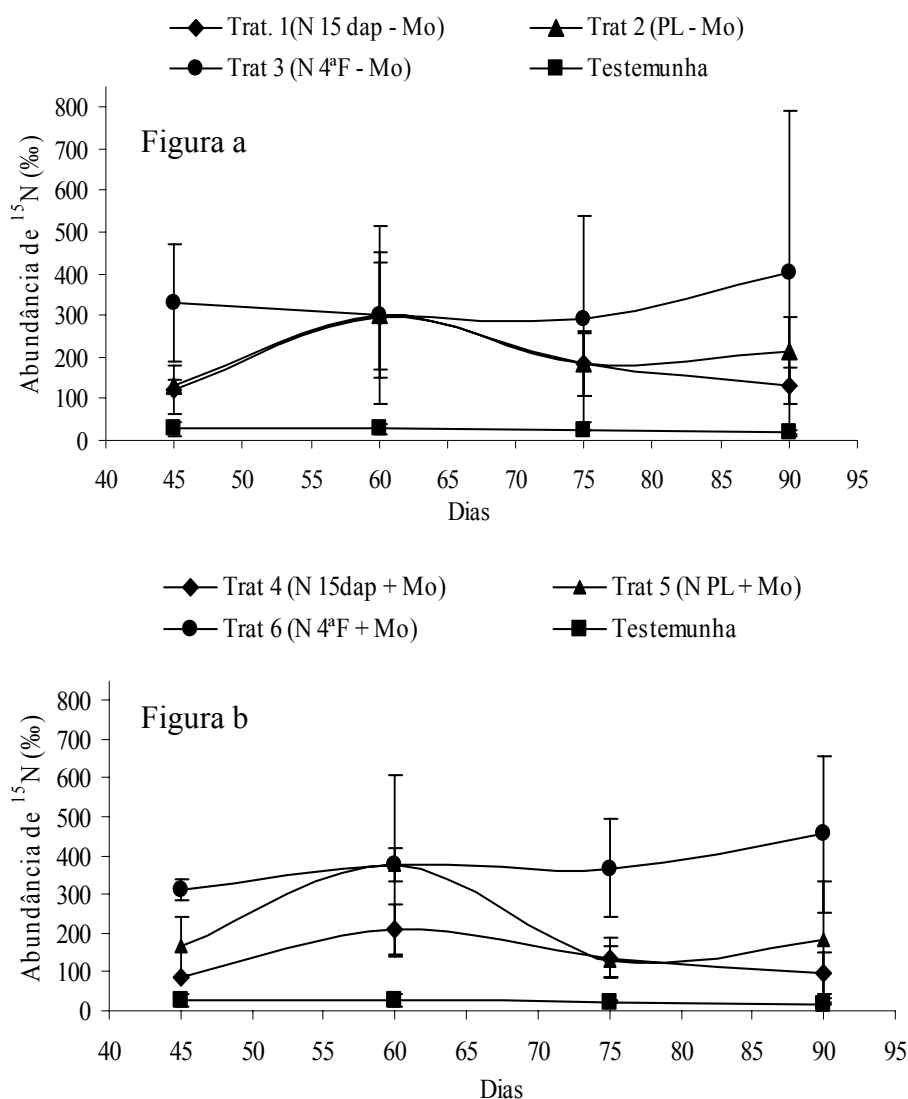


Figura 3. Abundância de nitrogênio (^{15}N) na folha de milho em função das épocas de aplicação de N na cultura do milho. Barras verticais: Intervalo de confiança.

Para o conteúdo N nos componentes individuais proveniente do fertilizante (% NPPF), os resultados variaram de 0,9 % no sabugo, quando da aplicação de N em pré-semeadura (T4), até 15,1 % quando avaliado no grão (T3) (Tabela 4). Novamente, independente da característica avaliada, a melhor resposta foi para a época de adubação de N quando a planta de milho se encontrava com quatro folhas expandidas, sendo a característica N no grão, detentora de melhores conteúdos do NPPF. Entre todas as características avaliadas, as melhores médias de aproveitamento de ^{15}N foram encontradas nos tratamentos: T3 (8,1%),

seguidos de T6 (7,4%), T2 (4,2%) e T5=T1 (3,3%). No entanto, quando a avaliação foi realizada nas épocas de aplicação do N, as variações ocorreram entre 1,0 a 14,6 % com médias de 2,9; 3,8 e 7,8 %, respectivamente para as épocas de aplicação: 1 - (pré-semeadura), 2 - (plantio) e 3 - (4ª folha), (Tabela 4). Os baixos valores de NPPF pode ter sido influenciada, conforme já comentado, pelo excesso de chuva (Figura 1) e/ou, pela imobilização do N pela palhada seca da aveia (7 %). Outros pesquisadores encontraram recuperação de N superiores aos encontrados nesse trabalho: 31 % obtidos por COELHO et al. (1991); LARA CABEZAS et al. (2000), de aproximadamente 24 %; DUETE (2008) de 39 %, de CANTARELLA et al. (2003) de 18 % a 28 % do total de N acumulado na parte aérea, de GAVA et al., (2006) de 27 % e 23 % do total de N acumulado na parte aérea do milho, respectivamente, no plantio convencional e plantio direto, proveniente do fertilizante.

Tabela 4. Porcentagem de N nos diversos componentes da planta proveniente do fertilizante (%NPPF), na folha (NF), no colmo (N Col), no Grão (N Grão), na palha do milho (N Palha), no sabugo (N Sab), no pendão (N Pend).e na raiz de milho (N Raiz), em função da época de aplicação de nitrogênio e do suprimento de Mo, em Coimbra – MG

Molibdênio	Nitrogênio	NF	N Col	N Grão	N Palha	N Sab	N Pend	N Raiz	Média
%NPPF.....									
- Mo	N 15 DAP	4,8 b	2,7 a	6,5 b	1,8 ab	1,2 a	3,2 c	2,9 b	3,3
		6,0 b	3,1 a	7,1 b	2,4 ab	2,7 a	4,9 bc	3,0 b	4,2
	N Plantio								
+ Mo	N 4ª Folha	12,0 a	4,3 a	15,2 a	3,0 ab	3,4 a	8,4 ab	10,2 a	8,1
		3,3 b	1,7 a	4,7 b	1,2 b	0,9 b	3,0 c	2,2 b	2,4
	N 15 DAP								
	N Plantio	5,4 b	1,5 a	6,1 b	1,6 ab	1,5 a	4,5 bc	2,6 b	3,3
	N 4ª Folha	13,4 a	3,9 a	14,1 a	3,4 a	2,2 a	9,1 a	6,0 ab	7,4
Épocas de aplicação do N									
	N 15 DAP	4,0 b	2,2 b	5,6 b	1,5 b	1,0 b	3,1 b	2,55 b	2,9
	N Plantio	5,7 b	2,3 b	6,6 b	2,0 ab	2,1 ab	4,9 b	2,8 b	3,8
	N 4ª Folha	12,7a	4,1 a	14,6 a	3,2 a	2,8 a	8,7 a	8,1 a	7,8
	CV (%)	26,65	34,55	24,00	33,92	45,54	26,02	32,77	

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Por se tratar de um experimento em campo, o N não recuperado das fontes ^{15}N , inclui além de possíveis erros experimentais não controlados, as perdas de N do solo por lixiviação, volatilização de amônia e desnitrificação (LARA-CABEZAS et al., 2000; CLOUGH et al., 2001) ou pela parte aérea, na forma de NH_3 junto à corrente transpiratória, na senescência foliar (HARPER e SHARPE, 1995) e até mesmo do N-orgânico que permanece no solo concordando com os resultados encontrados nesse trabalho. Infere-se, portanto, que o

potencial de mineralização do N-orgânico do solo constitui-se em uma importante fonte de N para a planta (SAMPAIO et al., 1995); muitas vezes, esse nitrogênio orgânico contido no solo exerce grande influência sobre os valores de NPPF obtidos em campo (GAVA et al., 2006 e LIANG e MACKENZIE, 1994).

CONCLUSÕES

1. O melhor suprimento de N ao longo do ciclo e a maior produtividade foram obtidos com a aplicação do fertilizante no estágio de quatro folhas expandidas do milho.
2. A aplicação do N na pré-semeadura do milho, 15 dias antes do plantio, demonstrou não ser recomendável para as condições de solo e clima estudadas.
3. A parte da planta do milho de maior alocação de N foi o grão.
4. A recuperação média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante foi de 6%.
5. A quantidade média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante foi de 9,21 kg ha⁻¹, mas quando da aplicação da Uréia no estágio de quatro folhas a recuperação chega ao redor de 16%.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e ao Departamento de Fitotecnia pelo espaço físico cedido para a realização do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, G. A. de A.; VIEIRA, C.; BERGER, P. G.; GALVÃO, J. C. C. Épocas de aplicação de molibdênio na cultura do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21. Londrina, 1996. Anais... Londrina: IAPAR, 1996. p.160.
- BASSO, C. J. & CERETTA, C. A. Manejo do nitrogênio no milho em sucessão a plantas de cobertura de solo, sob plantio direto. R. Bras. Ci. Solo, 24:905-915, 2000.
- CANTARELLA, H.; LERA, F. I.; BOLONHEZI, D.; LARA-CABEZAS, W. A. R. & TRIVELIN, P. C. O. Antecipação de N em milho em sistema de plantio direto usando ^{15}N -uréia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DE SOLO, 24. Ribeirão Preto. 2003. Anais. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Ciência de Solo, 2003. CD-ROM.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; BAHIA, A. F. C.; GUEDES, G. A. A. Balanço de nitrogênio ^{15}N em um Latossolo Vermelho-Escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. R. Bras. Ci. Solo, Campinas, v.15, p.187-193, 1991.
- COELHO, F. C. Efeito do nitrogênio e do Molibdênio sobre as culturas do milho e do feijão em monocultivos e em consórcio. Viçosa - MG: UFV, 1997. 132p. Tese de Doutorado em Fitotecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- COSTA, A. C. S. da; FERREIRA, J. C.; SEIDEL, E. P.; TORMENA, C. A. e PINTRO, J. C. Perdas de nitrogênio por volatilização da amônia em três solos Argilosos tratados com uréia. Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá, v. 26, n. 4, p. 467-473, 2004.
- CLOUGH, T. J.; SHERLOCK, R. R.; CAMERON, K. C.; STEVENS, R. J.; LAUGHLIN, R. J. & MÜLLER, C. Resolution of the ^{15}N balance enigma? Australian Journal of Soil Research, Victoria, v. 39, n. 6, p.1419-1431, 2001.
- DIOS, R. V.; BROYER, T. C. Deficiency symptoms and essentiality of molybdenum in corn hybrids. Agrochimica, Pisa, v.9, n.3, p.273, 1965.
- DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. C. O. & AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (^{15}N) pelo milho em latossolo vermelho. R. Bras. Ci. Solo, v.32:161-171, 2008.
- DUVICK, D. N. Genetic contributions to advances in yield of U.S. maize. Maydica, Bergamo, v.37, n.1, p.69-79, 1992.
- FERNANDES, F. C. S. & LIBARDI, P. L. Percentagem de recuperação de nitrogênio pelo milho, para diferentes doses e parcelamentos do fertilizante nitrogenado. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.6, n.3, p. 285-296, 2007.
- FERREIRA, A. C. de B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características Agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. Scientia Agricola, v.58, n.1, p.131-138, jan./mar. 2001.
- GAVA, G. J. de C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICHS, R.; SILVA, M. A. Balanço do nitrogênio da uréia (^{15}N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. Bragantia, Campinas - SP, v. 65, p. 477-486, 2006.
- GOMES, R. F.; SILVA, A. G.; ASSIS, R. L. & PIRES, F. R. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agronômicos da cultura do milho sob plantio direto. R. Bras. Ci. Solo, v.31:931-938, 2007.

- GROVE, L. T.; RITCHEY, K. D.; NADERMAN JUNIOR, G. C. Nitrogen fertilization of maize on Oxisol of the cerrado of Brasil. *Agronomy Journal*, Madison, v.27, p.261-265, 1980.
- GONG, Y. H.; ZHANG, J.; GAO, J. F.; LU, J. Y.; WANG, J. R. Slow export of photoassimilate from stay-green leaves during late grain-filling stage in hybrid winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, Oxford, v.191, n.4, p.292-299, 2005.
- HARPER, L. H.; SHARPE, R. R. Nitrogen dynamics in irrigated corn: soil-plant nitrogen and atmospheric ammonia transport. *Agronomy Journal*, Madison, v. 87, n. 4, p. 669-675, 1995.
- HILTON, B. R.; FIXEN, P. E.; WOODWARD, H. J. Effects of tillage, nitrogen placement, and wheel compaction on denitrification rates in the corn cycle of a corn-oats rotation. *Journal of Plant Nutrition*, Madison, v.17, p.1341-1357, 1994.
- LARA-CABEZAS, W. A. R.; ARRUDA, M. R. de; CANTARELLA, H.; PAULETTI, V.; TRIVELIN, P. C. O. & BENDASSOLLI, J. A. Imobilização de nitrogênio da uréia e do sulfato de amônio aplicado em pré-semeadura ou cobertura na cultura de milho, no sistema plantio direto. *R. Bras. Ci. Solo*, Viçosa, 29: p.215-226, 2005.
- LARA-CABEZAS, W. A. R. & COUTO, P. A. imobilização de nitrogênio da uréia e do sulfato de amônio aplicado em pré-semeadura ou cobertura na cultura de milho, no sistema plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31:739-752, 2007.
- LARA-CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; KONDÖRFER, G. H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho, em sistema plantio direto no triângulo mineiro (MG). *R. Bras. Ci. Solo*, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 363-376, 2000.
- LARA-CABEZAS, W. A. R.; KORNDORFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH_3 na cultura do milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluídas em sistema de plantio direto e convencional. *R. Bras. Ci. Solo*, Viçosa, v.21, p.489-496, 1997.
- LEA, P. J. & AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. *Annals of Applied Biology*, v.151, 269-275, 2007.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. London Academic Press Limited, 1995, 889p.
- LIANG, B. C.; MACKENZIE, A. F. Corn yield, nitrogen uptake and nitrogen use efficiency as influenced by nitrogen fertilization. *Canadian Journal of Soil Science*, Manitoba, v. 74, n. 2, p. 235-240, 1994.
- MELGAR, R. J.; SMYTH, T. J.; CRAVO, M. S.; SÁNCHEZ, P. A. Doses e épocas de aplicação de fertilizante nitrogenado para milho em Latossolo da Amazônia Central. *R. Bras. Ci. Solo*, Campinas, v.15, p.289-296, 1991.
- OLIVEIRA, P. P. A.; TRIVELIN, P. C. O. & OLIVEIRA, W. S. Eficiência da fertilização nitrogenada com uréia (^{15}N) em *Brachiaria brizantha* cv. marandu associada ao parcelamento de superfosfato simples e cloreto de potássio. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 27: 613-620, 2003.
- PEREIRA, S. L.; ARAÚJO, G. A. de A; SEDIYAMA, C. S.; VIEIRA, C. & MOSQUIM, P. R. Efeitos da adubação nitrogenada e molíbdica sobre a cultura do milho. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 23, n. 4, 1999.

- PEREIRA, S. L. Efeito da adubação nitrogenada e molibídica sobre a produtividade, teor de nitrogênio, atividade da redutase de nitrato e outras características da cultura do milho. Viçosa - MG: UFV, 1997. 89p. Tese de Doutorado em Fitotecnia – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- RAO, A. C. S.; SMITH, J. L.; PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I. Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods. *Fertilizer Research*, The Hague, v.33, p.209-217, 1992.
- RUSSEL, W. A. Contribution of breeding to maize improvement in the United States, 1920s-1980s. *Iowa State Journal of Research*, Ames, v.61, n.1, p.5-34, 1986.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; SILVA, V. M.; ALVES, G. D. Capacidade de suprimento de nitrogênio e resposta à fertilização de vinte solos de Pernambuco. *R. Bras. Ci. Solo*, Campinas v. 19, n.3, p. 269-279, 1995.
- SANGOI, L., ERNANI, P. R. & SILVA, P. R. F. Maize response to nitrogen fertilization timing in two tillage systems in a soil with high organic matter content. *R. Bras. Ci. Solo*, 31: 507-517, 2007b.
- SANGOI, L., CHMITT, A. & ZANIN, C. G. Área foliar e rendimento de grãos de híbridos de milho em diferentes populações de plantas. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.6, n.3, p. 263-271, 2007a.
- SILVA, S. A. Estimativa da herança do caráter “stay-green” em genótipos de trigo hexaplóide. 1999. 56p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- SILVA, E. C. da.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; VELOSO, M. E. da C.; TRIVELIN, P. C. O. Aproveitamento do nitrogênio (¹⁵N) da crotalária e do milheto pelo milho sob plantio direto em Latossolo Vermelho de Cerrado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.3, p. 739-746, mai-jun, 2006.
- SILVA, J. A. G. da; CARVALHO, F. I. F. de; OLIVEIRA, A. C. de; HARTWIG, I.; BERTAN, I.; CAETANO, V. da R. ; SCHIMDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; RIBEIRO, G.; BUSATO, C. C. Caráter stay-green e seu efeito no rendimento de grãos em trigo. *Bragantia* (São Paulo), v. 67, p. 693-699, 2008.
- SILVA, E. C.; FERREIRA, S. M.; SILVA, G. P.; ASSIS, R. L. & GUIMARÃES, G. L. Épocas e formas de aplicação de nitrogênio no milho sob plantio direto em solo de cerrado. *R. Bras. Ci. Solo*, v.29:725-733, 2005.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora.
- VILLAS BÔAS, R. L.; BOARETTO, A.E.; GODOY, L. J. G. DE; FERNANDES, D. M. Recuperação do Nitrogênio da Mistura de Uréia e Sulfato de Amônio por plantas do Milho. *Bragantia*, Campinas, v.64, n.2, p.263-272, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

A época de aplicação do nitrogênio interfere na atividade enzimática independente da adubação com molibdênio.

A maior produtividade de grãos e maior atividade da redutase do nitrato foi obtida com a aplicação de nitrogênio na época de que ao milho apresentou com quatro folhas completamente expandidas.

Os ciclos vegetativos dos cultivares de milho podem interferir na resposta da atividade enzimática.

O melhor suprimento de N ao longo do ciclo e a maior produtividade foram obtidos com a aplicação do fertilizante no estágio de quatro folhas expandidas do milho.

A aplicação do N na pré-semeadura do milho, 15 dias antes do plantio, demonstrou não ser recomendável para as condições de solo e clima estudadas.

A parte da planta do milho de maior alocação de N foi o grão.

A recuperação média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante, foi de 6 %.

A quantidade média de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante, foi de 9,21 kg ha⁻¹, mas quando da aplicação da Uréia no estágio de quatro folhas a recuperação chega ao redor de 16%.