



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE PLANTAS
FORRAGEIRAS TROPICAIS

Autor: Florence Taciana Veriato
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Deitos Fries

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março de 2018

FLORENCE TACIANA VERIATO

**METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE PLANTAS
FORRAGAIS TROPICAIS**

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daniela Deitos Fries

Co-orientadores: Prof. Dr. Fábio Andrade Teixeira
Prof. Dr. Aureliano José Vieira Pires

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março de 2018

633.2

V618m Veriato, Florence Taciana.

Metabolismo de carboidratos de plantas forrageiras tropicais. / Florence Taciana Veriato. – Itapetinga-BA: UESB, 2018.

92f.

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Daniela Deitos Fries e coorientação do Prof. D.Sc. Fábio Andrade Teixeira e Prof. D.Sc. Aureliano José Vieira Pires.

1. Forrageiras tropicais – Carboidratos - Fotoassimilados. 2. Forrageiras tropicais – Consórcio. 3. Leguminosas – Nitrogênio. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Fries, Daniela Deitos. III. Teixeira, Fábio Andrade. IV. Pires, Aureliano José Vieira. V. Título.

CDD(21): 633.2

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Forrageiras tropicais – Carboidratos - Fotoassimilados
2. Forrageiras tropicais – Consórcio
3. Leguminosas – Nitrogênio

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Titulo: "Metabolismo de carboidratos de plantas forrageiras tropicais."


Autor (a): Florence Taciana Veriato

Orientador (a): Prof^o. Dr^a. Daniela Deitos Fries

Co-orientador (a): Prof. Dr. Fábio Andrade Teixeira

Prof. Dr. Aureliano José Vieira Pires

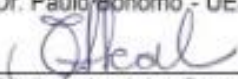
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



Prof^o. Dr^a. Daniela Deitos Fries – UESB
Orientador



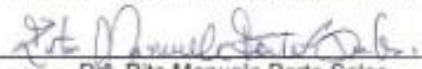
Prof. Dr. Paulo Bonomo - UESB



Prof^o. Dr^a. Cristiane Leal dos Santos – UESB



Dr^a. Ana Paula Gomes da Silva – PNP/UESB



Dr^a. Rita Manuele Porto Sales

Data de realização: 09 de março 2018

“Pois teu é o reino, o poder e a glória para sempre. Amém”

Mateus 6:13

Ao

Deus todo poderoso, que dá ao homem a possibilidade
de ser melhor a cada dia

Aos

meus pais, Eliana Maria Alves e Amarildo Veriato dos Santos pelo
incentivo e ensinamento diário e minha irmã Hortência Taciana
Veriato por todo carinho e amor

Aos

mestres e professores, pelos conhecimento
compartilhado e por nos incentivar a buscar cada
vez mais

Aos

amigos, verdadeiros, leais, sinceros, que
estiveram presentes nas horas fáceis e
difíceis

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo amor infinito e imensurável.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

À orientadora Professora Daniela Deitos Fries e co-orientadores Fábio Andrade Teixeira, Aureliano José Vieira Pires e pós doutora Ana Paula Gomes por coordenar este estudo e me amparar nas vezes que foi preciso.

À equipe LAFIEP, em especial, Daniel e Renata, que auxiliaram desde o início do doutorado, compartilhando todo conhecimento e também a amizade.

À todos os funcionários e colaboradores da UESB, que cuidam com muito zelo e nos tratam com tanto carinho: Raquel, Roberta, Dona Maria, Dai e Zé.

Às pessoas queridas, Dallyson, Dani, Neto, Palinha e Soninha, por toda amizade, carinho, risadas, choros, alegrias e frustrações que passamos juntos, foi excelente.

BIOGRAFIA

FLORENCE TACIANA VERIATO, filho de Amarildo Veriato dos Santos e Eliana Maria Alves, nasceu em Divinópolis, Minas Gerais, no dia 12 de agosto de 1987.

Em 22 de dezembro de 2012, concluiu o curso de Zootecnia, na Universidade Estadual de Montes Claros – Campus Avançado de Janaúba, Minas Gerais. Em março de 2013, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção de Animal, na mesma instituição.

Em março de 2014, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção de Ruminantes, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, realizando estudos na área de Forragicultura e Pastagem.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
I – REFERENCIAL TEÓRICO	01
1 Introdução.....	01
2 Plantas forrageiras tropicais.....	02
3 Consórcio de plantas forrageiras.....	05
4 Sombreamento das pastagens.....	07
5 Metabolismo de carboidratos.....	09
6 Referências Bibliográficas	15
II – OBJETIVOS.....	22
III – CAPÍTULO I – ATIVIDADE DE INVERTASES E AMILASES EM CAPIM MARANDÚ SOB SOMBREAMENTO E ADUBAÇÃO NITROGENADA.....	23
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Material e Métodos	26
Resultados e Discussão	31
Conclusões	44
Referências Bibliográficas	45
IV – CAPÍTULO II – ATIVIDADE DE INVERTASES E AMILASES EM ESTILOSANTES CAMPO GRANDE SOB SOMBREAMENTO E ADUBAÇÃO FOSFATADA	47
Resumo	47
Abstract	49
Introdução	51

	x
Material e Métodos	53
Resultados e Discussão.....	58
Conclusões	71
Referências Bibliográficas	72
V – CAPÍTULO III – METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM ESTILOSANTES CAMPO GRANDE SOB DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO E ADUBAÇÃO NITROGENADA	
Resumo	75
Abstract	76
Introdução	77
Material e Métodos	79
Resultados e Discussão.....	83
Conclusões	89
Referências Bibliográficas	90

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I Figura 1: Temperaturas máxima, média e mínima e umidade relativa do ar durante o período de 16 de agosto a 09 de novembro de 2017.....	27
CAPÍTULO II Figura 1: Temperaturas máxima, média e mínima e umidade relativa do ar durante o período de 16 de agosto a 09 de novembro de 2017.....	54
CAPÍTULO III. Figura 1: Precipitação (mm) e temperatura (°C) máxima, mínima e média durante o período experimental (nov/13 – jun/15). Fonte: INMET.....	79

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I.	
Tabela 1. Análise química do solo.....	26
Tabela 2. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folha de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois ciclos.....	32
Tabela 3. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em caule de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois ciclos.....	35
Tabela 4. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em raiz de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare.....	37
Tabela 5. Teores de açúcar redutor na folha (AR_f), açúcar redutor no caule (AR_c) e açúcar redutor na raiz (AR_r) de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois ciclos...	40
Tabela 6. Atividade da α e β -amilase em caule e raiz de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois ciclos.....	42
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Análise química do solo.....	53
Tabela 2. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folha de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos.....	59
Tabela 3. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em caule de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes	62

níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos.....

Tabela 4. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em raiz de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos..... 64

Tabela 5. Teores de açúcar redutor na folha (AR_f), açúcar redutor no caule (AR_c) e açúcar redutor na raiz (AR_r) de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos..... 66

Tabela 6. Atividade da α e β -amilase em caule e raiz de Estilosantes Campo Grande, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos..... 68

CAPÍTULO III

Tabela 1. Análise física do solo..... 80

Tabela 2. Análise química do solo..... 80

Tabela 3. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folhas e caules de Estilosantes Campo Grande, cultivado solteiro ou consorciado, sem (0) ou com 75 kg de nitrogênio por hectare, no período do verão..... 84

Tabela 4. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folhas e caules de Estilosantes Campo Grande, cultivado solteiro ou consorciado, com 0 ou 75 kg de nitrogênio por hectare no período do outono..... 86

Tabela 5. Teores de açúcar redutor em folhas e caule de Estilosantes Campo Grande, cultivado solteiro ou consorciado, com 0 ou 75 kg de nitrogênio por hectare no período do outono e verão..... 88

RESUMO

VERIATO, Florence Taciana Veriato. **Metabolismo de carbono de plantas forrageiras tropicais**. Itapetinga, BA: UESB, 2017. 92 p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).*

A constituição do espaço forrageiro engloba tanto o aspecto morfológico e estrutural quanto a bioquímica e fisiologia das plantas cultivadas. A interação dos fatores bióticos e abióticos refletem, nas respostas, aos diferentes estímulos, podendo alterar o metabolismo de carbono e a partição dos fotoassimilados em diferentes estádios de desenvolvimento. No primeiro capítulo, objetivou-se avaliar a atividade enzimática de invertases e amilases Capim Marandú sob diferentes níveis de sombreamento e na presença ou ausência de adubação nitrogenada. No segundo capítulo, objetivou-se avaliar a atividade enzimática de invertases e amilases Estilosantes Campo Grande sob diferentes níveis de sombreamento e na presença ou ausência de adubação fosfatada. E no terceiro, objetivou-se avaliar a atividade das enzimas invertases ácida e neutra em plantas de Estilosantes Campo Grande sob influência do sistema de cultivo e adubação nitrogenada, em duas estações do ano. Os experimentos do primeiro e segundo capítulo foram realizados em casa de vegetação no período de 01 de julho a 09 de novembro de 2016, localizada na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em esquema fatorial 4×2 , sendo 4 níveis de sombreamento (0%, 30%, 50% e 80% de sombreamento) e, com e sem adubação nitrogenada de 100 kg N.ha^{-1} (capítulo I) e adubação fosfatada de $150 \text{ kg P}_2\text{O}_5.\text{ha}^{-1}$ (capítulo II) em um delineamento em blocos ao acaso, totalizando 32 vasos plásticos e período experimental de 84 dias. Foi avaliado a atividade das enzimas invertase neutra do citossol (INC), ácida do vacúolo (IAV) e ácida da parede celular (IAPC), os teores de açúcares redutores e atividade das enzimas α e β -amilases, nas folhas, caules e raízes das plantas cultivadas. Adotou-se $\alpha = 0,05$. No capítulo I, a interação foi significativa para a atividade da INC na folha, tanto no 1º quanto no 2º ciclo. No 1º ciclo, a maior atividade foi observada quando as plantas foram adubadas, nos sombreamentos com 30, 50 e 80%. Assim como IAPC para os dois ciclos, sendo 1º ciclo, a maior atividade nos sombreamentos 0, 30 e 50%, quando as plantas foram adubadas. No entanto a interação não foi significativa para a atividade da IAV na folha, tanto no 1º quanto no 2º ciclo. A maior atividade da IAV foi observada nas plantas adubadas. A atividade da α -amilase no caule apresentou interação significativa apenas no 2º ciclo. Enquanto na raiz houve interação significativa, onde à pleno sol, a ausência de adubação promoveu maior atividade dessa enzima. Enquanto a 30 e 50%, as maiores atividades foram observadas na presença de adubação. A β -amilase no caule apresentou interação significativa apenas no 2º ciclo, onde em 80% de sombreamento, a adubação favoreceu a atividade, enquanto na raiz, não apresentou interação. Conclui-se que a adubação favorece o aumento das atividades enzimáticas. A atividade das invertases em pleno sol está diretamente ligada ao sistema osmorregulador das plantas, promovendo um gradiente de concentração a fim de translocar fotoassimilados para os sítios de maior necessidade energética. De maneira geral, as invertases aumentaram sua atividade quando sombreadas de 30 a 50%. A redução dos teores de açúcares redutores está relacionada a baixa taxa fotossintética e o aumento das enzimas degradativas α e β -amilase está associada a utilização das fontes de reservas para suprir as necessidades enérgicas nos drenos e translocação de nutrientes. No capítulo II, a atividade da INC na folha, no primeiro e segundo ciclo, apresentou interação significativa. No 1º ciclo, as plantas que receberam

adubação e com 0 e 30% de sombreamento apresentaram maiores atividades enzimáticas. Já à 50% de sombreamento, a maior atividade foi observada nas plantas não adubadas. Já no 2º ciclo, as maiores atividades enzimáticas foram observadas nas adubas e com 0, 50 e 80% de sombreamento, assim como na IAV apenas no primeiro ciclo, onde as plantas que adubas e à 0% de sombreamento apresentaram maiores atividades enzimáticas. No entanto IAPC, apresentou interação significativa somente no 1º ciclo. As plantas que receberam adubação e 30% de sombreamento apresentaram maiores atividades. Os teores de açúcares redutores na folha (AR_f) apresentaram interação significativa no primeiro ciclo, onde 0% de sombreamento, os maiores teores de AR_f foi observada na presença de adubação, enquanto a 80% de sombreamento, na ausência de adubação. A interação não foi significativa para a atividade da α -amilase no caule, no 1º ciclo, assim como a adubação e o sombreamento não diferiram quanto a atividade da α -amilase no caule, apresentando atividade média de $76,45 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No entanto no 2º ciclo, a interação significativa. A atividade da β -amilase no caule no 1º ciclo e na raiz, apresentou interação significativa. A maior atividade β -amilase no caule foi observada a 30 e 50% de sombreamento nas plantas não adubadas. De modo geral, o sombreamento não altera diretamente na atividade enzimática. No entanto, a adubação favorece a atividade das invertases, uma vez que o fósforo participa da constituição de diversas moléculas mediadores da fotossíntese e na composição de compostos orgânicos. Os teores de açúcares redutores em sombreamento de 30% sugerem alta atividade fotossintética. No entanto, a redução dos teores em função do aumento do sombreamento, é consequência da baixa interceptação luminosa. Em contrapartida, as enzimas degradativas α e β -amilases pouco se alteraram com o sombreamento e adubação, mostrando que ausência de adubação resulta em maior utilização das reservas e o aumento da atividade dessas enzimas está relacionado com o aumento do sombreamento. No capítulo III, visou-se verificar a atividade das invertases em Estilosantes Campo Grande, sob influência do sistema de cultivo e adubação nitrogenada, em duas estações. O experimento foi conduzido em uma área de Capim Xaraés, onde o Estilosantes foram implantados e submetidos a um esquema fatorial 2x2, sendo dois sistemas de cultivo (monocultura e consórcio) e ausência ou presença de adubação ($75 \text{ kg de N.ha}^{-1}$). Utilizou-se delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. A atividade das invertases neutra do citosol (INC), ácida do vacúolo (IAV) e ácida da parede celular (IAPC) e os teores de açúcares redutores, nas folhas e caules, foram avaliadas e analisadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. A interação entre sistema de cultivo e adubação nitrogenada foi significativa para INC, nas folhas, no verão, de forma que maior atividade ocorreu em função do consórcio e da adubação nitrogenada. O nitrogênio aumentou a atividade da INC no caule nos dois períodos e da IAV na folha, no verão, bem como diminuiu a IAPC, no outono. O sistema de cultivo influencia a atividade da INC, independente do período do ano e não interfere nas atividades das invertases ácidas. As invertases não apresentam alterações regulares em relação a adubação nitrogenada.

Palavras-chave: carboidratos, consórcio, fotoassimilados, leguminosas, nitrogênio

ABSTRACT

VERIATO, Florence Taciana Veriato. **Carbon metabolism of tropical forage plants.** Itapetinga, BA: UESB, 2017. 92 p. Thesis. (PhD in Animal Science, Concentration Area in Ruminant Production). *

The constitution of the forage space encompasses both the morphological and structural aspects and the biochemistry and physiology of the cultivated plants. The interaction of biotic and abiotic factors reflects on responses to different stimuli, which may alter the carbon metabolism and the partitioning of photoassimilates at different stages of development. In the first chapter the objective was to evaluate the enzymatic activity of invertases and amylases Capim Marandú under different levels of shading and in the presence or absence of nitrogen fertilization. In the second chapter, the aim of this study was to evaluate the enzymatic activity of invertases and amylases Campo Grande under different levels of shading and in the presence or absence of phosphate fertilization. The third objective was to evaluate the activity of the acid and neutral invertase enzymes in Estilosantes Campo Grande plants under the influence of the cultivation system and nitrogen fertilization in two seasons of the year. The experiments of the first and second chapter were carried out in a greenhouse during the period from July 1 to November 9, 2016, located in the State University of Southwest of Bahia, in a 4 x 2 factorial scheme, with 4 levels of shading (0% , 30%, 50% and 80% of shading), and with and without nitrogen fertilization of 100 kg N.ha⁻¹ (Chapter I) and phosphorus fertilization of 150 kg P₂O₅.ha⁻¹ (Chapter II) in a randomized blocks, totaling 32 plastic vessels and an experimental period of 84 days. The activity of the enzymes, cytosol-neutral invertase (Inv-N), vacuole acid (Inv-V) and cell-acid-acidity (Inv-CW) were determined, the levels of reducing sugars and the activity of α and β -amylases in leaves, stems and roots of cultivated plants. A = 0.05 was used. In chapter I, the interaction was significant for the activity of the Inv-N in the leaf, both in the 1st and 2nd cycles. In the 1st cycle, the highest activity was observed when the plants were fertilized, in the shading with 30, 50 and 80%. As the Inv-CW for the two cycles, being the first cycle, the highest activity in the 0, 30 and 50% shading, when the plants were fertilized. However, the interaction was not significant for Inv-V activity in the leaf, both in the 1st and 2nd cycles. The highest activity of the Inv-V was observed in the fertilized plants. The α -amylase activity in the stem showed significant interaction only in the 2nd cycle. While at the root, there was a significant interaction, where at full sun, the absence of fertilization promoted greater activity of this enzyme, while at 30 and 50% the highest activities were observed in the presence of fertilization. The β -amylase in the stem showed significant interaction only in the 2nd cycle, where in 80% of shading, fertilization favored the activity. While in the root, no interaction. It is concluded that the fertilization favors the increase of the enzymatic activities. The activity of the invertases in full sun is directly linked to the osmoregulatory system of the plants, promoting a concentration gradient in order to translocate photoassimilates to the sites of greater energy need. In general, the invertases increased their activity when shaded from 30 to 50%. Reduction of sugars is related to low photosynthetic rates and the increase of degradative enzymes α and β -amylase is associated with the use of reserve sources to meet the energetic needs of drains and translocation of nutrients. In chapter II, The Inv-N activity in the leaf, in the first and second cycle, presented significant interaction. In the 1st cycle, the plants that received fertilization and with 0 and 30% of shading presented greater enzymatic activities. At 50% shading, the highest activity was observed in the non-fertilized plants. In the second cycle, the highest enzymatic activities were observed in the fertilizers and with 0, 50 and

80% shading. As in the Inv-V only in the first cycle, where the plants that fertilized and at 0% of shading presented higher enzymatic activities. However, Inv-CW showed significant interaction only in the first cycle. The plants that received fertilization and 30% of shading presented greater activities. Reducing sugars contents in the leaf (ARf) showed significant interaction in the first cycle, where 0% of shading, the highest errors of ARf were observed in the presence of fertilization, while 80% of shading, in the absence of fertilization. The interaction was not significant for α -amylase activity in the stem, in the first cycle, as well as fertilization and shading did not differ in the activity of α -amylase in the stem, presenting a mean activity of $76.45 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. However in the 2nd cycle, the significant interaction. The activity of β -amylase in the stem in the 1st cycle and in the root showed a significant interaction. The higher β -amylase activity in the stem was observed at 30 and 50% shading in the non-fertilized plants. In general, shading does not directly alter enzymatic activity. However, fertilization favors the activity of invertases, since phosphorus participates in the constitution of several molecules mediating photosynthesis and in the composition of organic compounds. Reduction sugars content in shading of 30% suggests high photosynthetic activity. However, the reduction of the levels due to the increase of the shading is a consequence of the low light interception. On the other hand, degradative enzymes α and β -amylases did not change much with shading and fertilization, showing that the absence of fertilization results in greater utilization of the reserves and the increase of the activity of these enzymes is related to the increase of the shading. In chapter III, the objective of this study was to verify the activity of the invertases in *Estilosantes* under influence of the cultivation system and nitrogen fertilization in two seasons. The experiment was conducted in the Xaraés area, where *Estilosantes* was implanted and submitted to the 2x2 factorial scheme, being two cultivation systems (monoculture and mixed-pasture) and absence or presence of fertilization ($75 \text{ kg of N.ha}^{-1}$). A randomized block design, four replications, was used. The neutral cytosol (Inv-N), vacuole acid (Inv-V) and cell wall acid (Inv-CW) invertase activity and reducing sugar contents in the leaves and stems were evaluated and analyzed by the 5% probability F test. The interaction between cultivation system and nitrogen fertilization was significant for Inv-N, in the leaves, in the summer, so that greater activity occurred as a function of the consortium and nitrogen fertilization. Nitrogen increased activity of Inv-N, in the stem, in both periods and Inv-V in leaf, in summer, as well as decreased Inv-CW in the fall. The cultivation system influences the activity of the Inv-N, regardless of the period of the year and does not interfere with the activities of the acid invertases. The invertases do not show regular changes in relation to nitrogen fertilization.

Keywords: consumption, fertilization, invertases, photoassimilates, shading

* Advisor: Daniela Deitos Fries, Dr. UESB and Co-Advisors: Fábio Andrade Teixeira, Dr. UESB and Aureliano José Vieira Pires, Dr. UESB.

I – REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui área e condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de plantas forrageiras e estas constituem a base de alimentação do rebanho bovino. O sistema extensivo de criação é tido como a forma mais barata e competitiva no mundo, entretanto ele só é possível se as pastagens forem produtivas e o sistema de produção sustentável (Pereira et al., 2015). Devido a ausência de manutenção e recuperação, as áreas apresentam pastagens com baixa capacidade de produção e suporte, caracterizando-se, assim, um quadro de pastagens degradadas (Oliveira et al., 2009; Cavallini et al. 2010; Fernandes et al., 2010).

A deficiência de nutrientes nos solos acarreta problemas desde as características físicas e químicas 1ª até a qualidade da forragem produzida, reduzindo a oferta de alimento para o animal e o seu desempenho (Barcellos et al., 2008).

Apesar disso, a sustentabilidade dos sistemas pastoris pode ser melhorada com a utilização de leguminosas em consórcio com gramíneas (Skonieski et al., 2011), reduzindo os gastos diretos com fertilizantes, melhorando a disponibilidade de forragem pelo aporte de nitrogênio ao sistema por meio de sua reciclagem e transferência para a gramínea consorciada e aumentar também o período de utilização das pastagens (Barcellos et al., 2008), desde que os recursos bióticos e abióticos não sejam um fator limitante para o desenvolvimento de uma das espécies.

A adaptação das plantas forrageiras ao sombreamento depende da sua plasticidade fenotípica, isto é, da sua capacidade de realizar modificações morfofisiológicas em função das variações da quantidade e qualidade de luz incidente. (Gobbi et al., 2011). Em contrapartida, o sombreamento, em níveis altos e/ou persistentes, diminui o crescimento da parte aérea, o que consequentemente reduz a fotossíntese, afetando assim o crescimento das raízes e absorção de nutrientes, como consequências negativas sobre a produção de forragem (Andrade, 2012).

Os carboidratos são sintetizados nas folhas através da fotossíntese e translocados para tecidos na forma de sacarose, a fim de sustentar o metabolismo e crescimento ou para serem armazenados como sacarose ou amido. Por conta disso, as plantas estão

continuamente ajustando seu crescimento e desenvolvimento para otimizar a atividade fotossintética frente a competição por luz (Taiz et al., 2017).

Nos últimos anos, tornou-se evidente que estes açúcares, principalmente a sacarose e os seus produtos de clivagem, são importantes sinais metabólicos que afetam a expressão de diferentes classes de genes e estão envolvidos na regulação do desenvolvimento das plantas. Assim, o metabolismo da sacarose, fracionamento e detecção, é vital para todas as fases do ciclo de vida da planta (Roitsch & González, 2004).

As invertases são enzimas que regulam a degradação da sacarose e estão presentes em três isoformas distintas, sendo as invertases ácidas do vacúolo e da parede celular e a neutra do citossol. As invertases atuam diretamente no sistema osmorregulador, respostas ao estresse abiótico, extensibilidade da parede celular e distribuição de sacarose nos sítios de maior necessidade (Taiz et al., 2017).

Dessa forma, a constituição do espaço forrageiro engloba tanto o aspecto morfológico e estrutural quanto a bioquímica e fisiologia das plantas cultivadas. A interação dos fatores bióticos e abióticos refletem nas respostas aos diferentes estímulos, podendo alterar o metabolismo de carbono e a partição dos fotoassimilados em diferentes estádios de desenvolvimento

A adubação, fonte de suplementação de nutrientes ao solo, disponibiliza as plantas minerais que participam ativamente na bioquímica como mediadores da fotossíntese, na constituição dos novos compostos, reprodução e multiplicação das células, podendo assim alterar as atividades das enzimas invertases e conseqüentemente nos teores de carboidratos. No entanto, pouco se sabe sobre a atividade dessas enzimas no metabolismo de forrageiras tropicais sob condições de sombreamento e adubação.

2. PLANTAS FORRAGEIRAS TROPICAIS

As plantas forrageiras tropicais são utilizadas, no Brasil, como principal fonte de alimentação pelos animais ruminantes. O desempenho animal é caracterizado em função da ingestão de matéria seca, da qualidade da forragem e do potencial genético do animal, enquanto a capacidade de suporte é em função do potencial de produção de matéria seca da forrageira e da eficiência de colheita (Boin, 1986).

As plantas do gênero *Brachiaria* são caracterizadas pela sua grande flexibilidade de uso e manejo. Dentre as braquiárias, a *Brachiaria brizantha* cv Marandú (Capim-Marandú) adquiriu uma grande expressividade nas áreas de pastagens cultivadas e, por essa razão, tornou-se uma das plantas forrageiras mais detalhadamente estudadas no meio científico nacional (Paciullo et al., 2011).

Pertencente ao gênero *Brachiaria*, classificada como *Brachiaria brizantha* (Hochst ex A.RICH.) STAPF. cv. Marandu, esta gramínea é originária de uma região vulcânica da África, onde os solos geralmente apresentam bons níveis de fertilidade, com precipitação pluviométrica anual ao redor de 700 mm e cerca de 8 meses de seca no inverno (Rayman, 1983).

O capim Marandú é um ecotipo de *Brachiaria brizantha* que vem sendo estudado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) em Campo Grande, MS, e pelo Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC) em Planaltina, DF, desde 1977 e 1979, respectivamente.

As qualidades forrageiras encontradas nessa gramínea indicaram-na como excelente alternativa para o pecuarista, o que levou ao lançamento do cultivar pelos dois centros de pesquisa, recomendando-a para cerrados de média a boa fertilidade. Esse cultivo tem mostrado resistência às cigarrinhas-das-pastagens, alta produção de forragem, persistência, boa capacidade de rebrota, tolerância ao frio, à seca e ao fogo e alta produção de sementes viáveis. Exige solos bem drenados, de média a alta fertilidade onde produz de 8 a 20 toneladas de matéria seca por hectare, por ano. Aceita o pastejo rotacionado, produção de feno e silagem (EMBRAPA 2016).

De acordo com a Embrapa (2016), Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de sementes de plantas forrageiras, contando com cerca de 115 milhões de hectares de pastagens cultivadas, das quais aproximadamente 51,4 milhões de hectares encontram-se estabelecidas com *B. brizantha* cv. Marandu. A grandeza do número retrata a hegemonia deste cultivar na pecuária brasileira. Considerando que apenas um terço dessa área (cerca de 17 milhões de hectares) esteja sujeita ao ataque de cigarrinhas-das-pastagens, situação na qual a gramínea demonstra todo seu potencial em comparação à *B. decumbens*, a qual substituiu, os benefícios econômicos relativos gerados pelo cultivo foram de aproximadamente R\$ 2,7 bilhões em 2015.

O capim Marandú é uma planta cespitosa, muito robusta, de 1,5 a 2,5 metros de altura, com colmos iniciais prostrados, mas produzindo perfilhos predominantemente eretos. Rizomas muito curtos e encurvados. Colmos floríferos eretos, frequentemente com perfilhamento nos nós superiores, que leva à proliferação de inflorescências, especialmente sob regime de corte ou pastejo, bainhas pilosas e com cílios nas margens, geralmente mais longas que os entre-nós, escondendo os nós, o que confere a impressão de haver densa pilosidade nos colmos vegetativos. Lâminas foliares linear-lanceoladas, esparsamente pilosas na face ventral e glabras na face dorsal. Inflorescências de até 40 cm de comprimento, geralmente com 4 a 6 racemos, bastante equidistantes ao longo do eixo, medindo de 7 a 10 cm de comprimento (Valls; Sendulsky, 1984).

A cultivar Marandú pode ser diferenciado de outros ecotipos de *B. brizantha*, pela associação obrigatória das seguintes características: plantas sempre robustas e com intenso afilamento nos nós superiores dos colmos floríferos; presença de pêlos na porção apical dos entre-nós; bainhas pilosas e lâminas largas e longas com pubescência apenas na face inferior, glabras na face superior e com margens não cortantes, raque sem pigmentação arroxeadada e espiguetas ciliadas no ápice (Valls; Sendulsky, 1984).

Nos últimos anos, o Estilosantes Campo Grande, uma leguminosa forrageira, vem se destacando como forrageira, o que tem resultado em aumento considerável da área plantada com a cultivar nos sistemas de produção animal (Barcellos et al., 2008). O Estilosantes Campo Grande é uma cultivar composta da mistura física de sementes de *Stylosanthes capitata* (80%) e *S. macrocephala* (20%), com adaptação a solos de baixa fertilidade. E como os solos do Brasil apresentam baixa fertilidade natural, sendo o fósforo um elemento limitante para o crescimento das plantas de *S. capitata*, uma vez que sua deficiência reduz significativamente a produção de matéria seca desta espécie (Paulino et al., 2008).

A composição obtida foi denominada estilosantes-campo-grande e registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) como cultivar. *Stylosanthes capitata* tem hábito de crescimento ereto, podendo atingir até 1,5 m de altura. A cor das flores varia do bege ao amarelo. O florescimento da espécie, em Campo Grande, MS, ocorre a partir da segunda quinzena de maio e a maturação das sementes ocorre no final de junho. *Stylosanthes macrocephala* possui hábito de crescimento semi-ereto ou decumbente, podendo tornar-se mais ereto em condições de competição por luz. A altura

das plantas pode também atingir 1,5 m e seu florescimento e maturação das sementes é cerca de um mês mais precoce, quando comparadas às de *S. capitata*. As flores são, em sua maioria, amarelas, podendo ser encontrados exemplares com tonalidade bege.

O conhecimento das variáveis que influenciam a qualidade da forragem é importante para definir estratégias de manejo em áreas de solos de baixa fertilidade. As exigências de fertilidade do solo do Estilosantes Campo Grande podem ser consideradas baixas, mostrando bem adaptada à acidez dos solos dos Cerrados, podendo crescer e produzir forragem e sementes em solos cuja saturação por bases esteja entre 30% e 35%, na camada de 0 a 20 cm de profundidade. Observou-se, também, que essa leguminosa pode suportar saturação de alumínio de até 35 % sem prejuízos para a produção (Fernandes et al., 2005).

Nas plantas de Estilosantes Campo Grande, ocorre o processo de fixação biológica de nitrogênio do ar, por meio da associação simbiótica de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* (rizóbio). Em monocultivo, o Estilosantes consegue fixar até 180 kg de N/ha/ano. Já no consórcio com gramíneas, na proporção de 20% a 40% da leguminosa, em solos arenosos de baixa fertilidade, o estilosantes fixa em média 60 a 80 kg de N/ha/ano, sendo apenas parte desse nitrogênio liberada para as gramíneas no primeiro ano, quando seu efeito maior é na melhoria da dieta dos animais. A partir do segundo ano, quando ocorre a ciclagem de nutrientes pela morte de partes das plantas, o N orgânico fixado é mineralizado, tornando-se disponível para a gramínea em consorciação, melhorando a disponibilidade total de forragem em até 50%, como também a qualidade da dieta para o animal (EMBRAPA 2007).

3. CONSÓRCIO DE PLANTAS FORRAGEIRAS

A pastagem consorciada de gramíneas e leguminosas é aquela formada com, no mínimo, duas espécies de plantas forrageiras em uma mesma área. Entre as principais razões para a utilização desse consórcio, destaca-se a baixa disponibilidade de nitrogênio nos solos com pastagens, no Brasil e o baixo teor proteico de algumas gramíneas forrageiras tropicais quando comparado ao das leguminosas. As leguminosas forrageiras têm sido tradicionalmente consideradas fonte barata de suplemento protéico e adubo nitrogenado para a produção de ruminantes em pastagens (Andrade, 2012).

O uso de leguminosas em consórcio com gramíneas pode reduzir os gastos diretos com fertilizantes; aumentar a qualidade e a diversificação da dieta consumida pelos animais; melhorar a disponibilidade de forragem pelo aporte de nitrogênio ao sistema por meio de sua reciclagem e transferência para a gramínea consorciada e aumentar também o período de utilização das pastagens (Barcellos et al., 2008).

As leguminosas também desempenham um papel fundamental como fornecedoras de nutrientes quando o sistema está estabilizado, uma vez que as plantas dessa família têm a vantagem de prontamente disponibilizar nutrientes para culturas sucessoras, em virtude da rápida decomposição de seus resíduos (Bettioli et al., 2015).

No consórcio entre gramíneas e leguminosas, o nitrogênio pode ter sua disponibilidade aumentada no solo pela inclusão de leguminosas forrageiras no sistema (Gobbi et al 2011). Devido à sua simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, as leguminosas podem obter nitrogênio fixado biologicamente por estas bactérias e cedê-lo diretamente à gramínea para mineralização de seus restos orgânicos. Por outro lado, o consórcio é difícil de ser mantido em sistemas pecuários, pois quando se misturam duas espécies diferentes, são evidenciados potenciais competitivos existentes entre ambas, tais como efeitos alelopáticos ou de competição por luz, água e nutrientes do solo, que podem fazer com que haja predominância de uma espécie, podendo chegar até a supressão da outra (Haynes 1996).

De acordo com Guilherme (2000), uma redução considerável no crescimento de espécies, tanto em combinações intra como interespecíficas, é resultante de competição espacial entre grupos de plantas que ocupam o mesmo local em um determinado período de tempo. Desse modo, o arranjo equidistante de plantas minimiza o auto-sombreamento e retarda o início da competição intraespecífica por recursos do solo, levando a uma eficiência máxima na captura e uso de recursos por uma cultura (Zanine; Santos, 2004).

Carvalho et al. (2002), avaliando o efeito do sombreamento em um consórcio entre seis gramíneas forrageiras tropicais e árvores de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*), observaram que o sombreamento retardou o início do florescimento de todas as gramíneas, em maior ou menor grau, dependendo da espécie, causada pela diminuição da taxa fotossintética e produção dos fotoassimilados.

4. SOMBREAMENTO DAS PASTAGENS

As plantas são seres fotoautótrofos e, portanto, dependem da aquisição de energia luminosa para o crescimento e persistência. O sombreamento pode trazer benefícios, como, aumento no teor de nitrogênio na folha que podem repercutir em melhorias do teor protéico da forragem (Sousa, 2012), e de minerais na forragem, tais como cálcio, fósforo e potássio (Sousa et al., 2010), benefícios para os componentes do sistema solo/planta/animal, destacando a conservação do solo e da água, a possibilidade de melhoria das condições físicas, químicas e da atividade biológica na superfície do solo, e no conforto térmico para os animais (Leme et al., 2005) e incorporação gradativa de biomassa das árvores (folhas, flores, frutos etc) à pastagem (Sánchez et al., 2003). Quanto aos teores de fibra e a digestibilidade, os resultados são contraditórios, embora alguns indiquem tendência de redução dos teores de fibra em detergente neutro e aumento da digestibilidade *in vitro* da matéria seca, em condições de sombra (Carvalho, 2001). No entanto, a diminuição progressiva da luminosidade disponível para o sub-bosque influencia na produtividade do pasto, uma vez que a produção de carboidratos se torna reduzida (Paciullo et al., 2011).

Quando a planta está sob ameaça de sobrevivência devido a limitações de luz, mecanismos evolutivos direcionam estratégias adaptativas altamente plásticas para tolerar ou escapar do sombreamento causado pela vegetação vizinha (Franklin; Whitelam 2005). Por conta disso, as plantas estão continuamente ajustando seu crescimento e desenvolvimento para otimizar a atividade fotossintética frente a competição por luz.

As plantas são hábeis em utilizar informações do ambiente para detectar precocemente a proximidade de plantas vizinhas ou sinais de estresse e, ajustar sua morfologia e fisiologia para antecipar e, eventualmente, escapar de um potencial impacto negativo relacionado com a limitação de recursos sobre seu crescimento e reprodução (Aphalo; Ballaré 1995).

Grime (2001) define competição como a tendência das plantas vizinhas em utilizar o mesmo *quantum* de luz, íon de nutriente mineral, molécula de água ou volume de espaço. De acordo com essa definição, a competição se refere exclusivamente à captura de recursos.

De acordo com Park et al. (2001), existem dois fatores que influenciam o resultado da competição: I) exibição da plasticidade fenotípica que pode ser usada por uma planta

em ambiente competitivo; II) potencial de habilidade competitiva (inclui tamanho da semente, tamanho da muda, tempo de aparecimento e tamanho da planta). Todas estas características, de uma maneira ou de outra, influenciam ou refletem a habilidade de uma planta individual para captar recursos.

O funcionamento de uma população de plantas pode ser estudado em diferentes níveis de organização: órgãos da planta, perfilhos e população da planta. O enfoque clássico dado para a modelagem de cultura considera a população de plantas como uma entidade total, que troca energia e massa com o ambiente. O funcionamento de tal sistema é, portanto caracterizado por fluxo de energia (radiação, calor sensível) e massa (CO_2 , H_2O e minerais) entre a população de planta total, solo e atmosfera. A eficiência fotossintética, representada pela incorporação do CO_2 atmosférico, pode definir o sucesso de plantas sob competição (Lemaire, 2001).

O sombreamento é uma das condições ambientais realizada pela vegetação vizinha que gera a redução da energia disponível para a fotossíntese, conseqüentemente afeta a produção e partição de fotoassimilados, o que reflete sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (Poorter; Navas 2003).

Dentre os elementos meteorológicos, a temperatura do ar e a radiação solar, em especial a radiação fotossinteticamente ativa (RFA), são os que mais influenciam, direta ou indiretamente, o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, pois interferem em processos fisiológicos importantes como transpiração, fotossíntese e respiração (Paciullo et al., 2011).

De acordo com (Paciullo et al. 2007; Barro et al. 2008; Bernadino; Garcia, 2009; Varella et al. 2010), acima de 50% de transmissão RFA, o sombreamento é considerado sombra fraca, ou seja, há menor interceptação da copa das plantas, transmitindo maior quantidade de RFA para parte base da planta, ao passo que abaixo de 50% são considerados sombra moderada a intensa.

Entre as modificações morfológicas que ocorrem em ambientes com baixa luminosidade e que interferem a quantidade e qualidade da forragem, podem-se destacar a área foliar (AF), área foliar específica (AFE) e o número de folhas e relação folha/colmo (Garcez Neto et al., 2010).

Neste contexto, Lin et al. (2001) afirmam que dentre as principais alterações morfológicas causadas pelo sombreamento estão o aumento da área foliar e diminuição

da massa específica da folha. Outra característica que é influenciada pela baixa luminosidade é a razão folha/colmo (F/C). Plantas sombreadas apresentam menor F/C que plantas que crescem a pleno sol, o que infere diretamente na obtenção dos produtos da fotossíntese.

Segundo Gobbi et al. (2011), em ambientes sombreados, as plantas tendem a possuir maior AFE para elevar ao máximo a captação de luz disponível. Esse aumento está diretamente relacionado à aclimação que esta planta sofre, permitindo a mesma cresce em ambientes de baixa luminosidade. Deste modo, Kephart (1992) afirma que o aumento da área foliar em ambientes sombreados é uma adaptação morfofisiológica da planta para manter a área de captação de radiação solar.

5. METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

A fotossíntese é o meio pelo qual as plantas assimilam carbono e transporta os carboidratos produzidos para os tecidos para manutenção e crescimento celular. No entanto, tem sido observada a baixa associação entre fotossíntese foliar e produção de massa seca em forragem quando observado em nível de área foliar (Moreno, 2004; Lara, 2007; Pequeno, 2010), porque as folhas individuais apresentam grande variação na capacidade fotossintética, que é determinada por vários fatores, como temperatura, radiação solar e desenvolvimento da folha (Zelitch, 1982; Braga et al., 2006). Realmente, as variações de temperatura e luminosidade e a diferença na idade fisiológica das folhas ao longo do perfil vertical do dossel são grandes, conferindo diferentes potenciais fotossintéticos às mesmas (Loomis & Williams, 1969).

As folhas mais jovens e completamente expandidas realizam fotossíntese com intensidade máxima e os seus assimilados servem não apenas para sua própria manutenção, mas também para atender às demandas do meristema apical, sistema radicular e das folhas em formação. A folha, cujo limbo está parcialmente exposto, não transloca assimilados para outras partes do perfilho, usando-os para o seu próprio desenvolvimento (Milthorpe & Davidson, 1966). Com isso, a idade das folhas remanescentes após a desfolha e sua relação com a eficiência de absorção de CO₂ é importante para a produção de forragem.

Os vegetais apresentam diferentes tipos de carboidratos de reserva, solúveis e insolúveis, e a predominância destes nos tecidos, bem como a sua estrutura química, variam entre espécies, órgãos, tecidos e células, além de variar ao longo do dia e das diferentes estações do ano (Lewis, 1984). Esses carboidratos são oriundos da redução do carbono, ocorrente na etapa bioquímica da fotossíntese e possuem diversas atribuições no metabolismo vegetal, dentre elas o armazenamento e translocação de carboidratos; e a proteção contra condições adversas, como a restrição ou excedente hídrico, alta salinidade e temperaturas extremas (Keller; Pharr, 1996).

Em diversas espécies vegetais, nas folhas (local considerado como fonte), ocorre a síntese de carboidratos, os quais são translocados para os tecidos (drenos) na forma de sacarose para suprir o metabolismo e desenvolvimento vegetal e/ou para o acúmulo na forma de sacarose ou amido. Esses processos são acompanhados por constantes mudanças nas relações fonte-dreno (Roitsch; González, 2004). O mecanismo do acúmulo ativo de sacarose é dependente da maturidade dos tecidos, isto é, há diferença entre tecidos maduros e imaturos devido, principalmente, à concentração de invertases e a necessidade de crescimento (Alexander, 1973).

Os carboidratos produzidos pela fotossíntese podem ser redirecionados para utilização nos tecidos mediante a sua necessidade, sendo na forma de solúvel e transportada pelo floema (sacarose) ou no armazenamento de reservas na forma insolúvel (amido). A síntese de sacarose ocorre no citosol e se dá pela formação de UDP-glucose que se combina com frutose-6-fosfato e produz a sacarose-6-fosfato. Esta última é convertida para sacarose por ação de uma fosfatase. Já a síntese do amido ocorre no cloroplasto. A partir da adição de ADP-glucose, forma-se um polímero de glicose unido por ligação glicosídica α -1,4, formando o amido (Taiz et al, 2017). As sínteses de amido e de sacarose apresentam praticamente os mesmos intermediários (frutose-1,6-bisfosfato, frutose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, etc.). No entanto, estas vias biossintéticas possuem izoenzimas, que são únicas para cloroplasto mediada pela ortofosfato formando amido e citosol mediada pela triose-fosfato formando sacarose.

A síntese de sacarose é realizada principalmente pela sacarose fosfato sintase (SPS), uma enzima alostérica ativada pela glucose-6-fosfato e inibida pelo ortofosfato. A degradação da sacarose, e conseqüentemente, o estabelecimento do dreno, pode ser realizada tanto pela sacarose sintase (SuSy) quanto pela invertase (Taiz & Zeiger, 2013).

A principal função da SuSy é clivar a sacarose para síntese de amido (Déjardin et al., 1997) e parede celular (Nakai et al., 1999), pelo simples fato de que um dos produtos de sua hidrólise é UDP-glicose, precursor para síntese de amido e parede celular de forma reversível. As invertases catalisam a hidrólise altamente exotérmica e irreversível da sacarose em glicose e frutose. Em contraste, uma clivagem reversível da sacarose é catalisada pela sintase da sacarose, em UDPG e frutose, possuindo um papel importante no metabolismo da sacarose em diversas rotas bioquímicas relacionadas a funções metabólicas, estruturais e de armazenamento em células de plantas (Winter & Huber, 2000).

O metabolismo de partição e acúmulo da sacarose são vitais no ciclo de vida vegetal e sua utilização como fonte de energia e de carbono requer sua hidrólise. As enzimas invertases quebram a sacarose em hexoses, disponibilizando às células carbono e energia para os processos de respiração, bem como energia para a síntese de numerosos compostos diferenciados. As invertases podem, ainda, estar envolvidas no transporte de sacarose a longas distâncias por criar o gradiente de concentração de sacarose entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema (Eschrich, 1980; Roitsch; González, 2004). As enzimas invertases nas forrageiras são encontradas em diversas isoformas, com diferentes propriedades bioquímicas e localização subcelular, isto é: invertase neutra, invertase ácida vacuolar e invertase ácida de parede celular (Tymowska-Lalanne e Kreis, 1998; Rohwer; Botha, 2001).

A invertase ácida é composta pelo somatório das invertases do espaço externo, ou seja, parede celular e do vacúolo, sendo encontrada em quantidade superior e praticamente em tecidos imaturos. A atividade dessa isoenzima pode ser alta ou baixa, respectivamente, em condições favoráveis ao crescimento ou em condições desfavoráveis, como por exemplo, estresse hídrico, fotoperíodo curto e temperaturas baixas (Gayler; Glasziou, 1972; Legendre, 1975). As flutuações, nos teores de açúcar, durante o crescimento vegetal, é consequência do nível da enzima invertase ácida (Gayler; Glasziou, 1972; Lingle, 1999), uma vez que esta apresenta relação estreita e inversa com o conteúdo de sacarose e açúcares totais, corroborando com outros autores (Hawker, 1985; Su et al., 1992; Zhu et al., 1997; Terauchi et al., 2000).

A expansão celular dos tecidos imaturos requer hexoses como fonte de energia e carbono, e depende da direção da força de alongamento celular, consequência da

manutenção da pressão osmótica celular e do aumento da extensibilidade da parede celular. Portanto, diversos estudos evidenciam a atuação da invertase ácida no processo de osmorregulação (Gayler; Glasziou, 1972; Gibeaut et al., 1990). Nos tecidos maduros do colmo, onde os processos de crescimento estão finalizados, ocorre declínio da concentração da invertase ácida e, então, a invertase neutra torna-se predominante, situando-se, aparentemente, no citoplasma. Essa enzima, mesmo em baixo teor de 15 a 20%, promove o armazenamento de sacarose nos espaços intercelulares (Lingle, 1999).

Das invertases ácidas, que atuam com atividade máxima em pH 5,5, uma delas está localizada nos vacúolos das células, relacionando-se com o armazenamento de açúcares, regulação osmótica e respostas a estresses abióticos. Além disso, a invertase vacuolar pode controlar a rota primária de clivagem da sacarose em tecidos em expansão ou maduros, contribuindo para o fluxo de hexoses através do tonoplasto, intermediando a entrada destas no metabolismo citoplasmático. Já a outra isoforma ácida, encontrada predominantemente nos tecidos em expansão, está ligada à parede celular e envolvida na partição e distribuição da sacarose fora dos tecidos dreno, no aploplasto, estabelecendo um gradiente de concentração dos tecidos fonte para os drenos (Roitsch; González, 2004; Yao et al., 2009).

A invertase neutra ou alcalina está localizada no citoplasma, sendo considerada uma enzima de manutenção, já que está envolvida na degradação da sacarose quando as atividades da invertase ácida da parede celular e sacarose sintase estão baixas. A invertase neutra solúvel apresenta um máximo de atividade em pH 7,0 e predomina em tecidos completamente expandidos. Isso sugere o envolvimento desta enzima no catabolismo e acúmulo de sacarose no vacúolo (Koch, 2004). Há estudos que relatam que existem alterações significativas na intensidade e nos níveis enzimáticos das invertases neutra e ácidas, quando em diferentes estádios de maturação (Leite et al., 2009).

Quanto as enzimas de degração de reservas, somente com a ação conjunta da α -amilase, β -amilase, enzima desramificadora e α -glicosidase pode-se obter *in vivo*, a completa hidrólise do amido (Beck; Ziegler, 1989; Sarikaya et al., 2000). No entanto, a única enzima, em plantas, capaz fazer a liberação de glicanos solúveis a partir de grânulos de amido seria a α -amilase (Henrissat; Bairoch, 1996).

A α -amilase (1,4- α -D glucanohidrolase, EC 3.2.1.1, enzima dextrinizante) possui atividade endohidrolítica e atua aleatoriamente sobre ligações glicosídicas α -1,4,

produzindo uma mistura de oligossacarídeos que contêm ligações α -(1-6), glicose, maltose e dextrinas. Ela apresenta papel central no processo de hidrólise do amido e, por possuir atividade endo-amilolítica, fornece o aumento da disponibilidade de substrato para outras enzimas de degradação, sendo a enzima responsável pelo ataque inicial aos grânulos, atuando sobre as cadeias dos componentes do amido em qualquer ponto no interior da cadeia linear (Preiss, 1982; Beck; Ziegler, 1989; Irving, 1999).

A β -amilase (1,4- α -D-glicano maltoidrolase, EC 3.2.1.2) pode ser encontrada em vegetais superiores e em algumas bactérias gram-positivas (Pujadas et al., 2001), é classificada na família 14 das glicosídeo-hidrolases (GH-14) e atua como exo-hidrolase atuando na penúltima ligação α -1,4-glicosídica do amido, glicogênio e oligossacarídeos relacionados. A β -amilase é uma exoenzima e hidrolisa ligações α (1-4), a partir da extremidade não-redutora, produzindo maltose (Clark et al., 2003; Sahlström et al., 2003; Mohan et al., 2005; Brien; Fowkes, 2005).

A quantidade de α e β -amilase depende de vários fatores: variedade, condições climáticas, competição por nutrientes; quanto mais elevada à temperatura, maior a atividade de degradação dessa enzima (Saika et al., 2005).

O sombreamento, por reduzir a quantidade de luz que chega aos sítios de fotossíntese, acarreta em menor produção de fotoassimilados. Durante o período de estresse por sombreamento ou deficiência energética, a planta utiliza suas reservas com a degradação do amido para manter seu metabolismo basal e crescimento. No entanto, com a severidade e intensidade, esse estresse pode exaurir as reservas, tornando insustentável para o metabolismo e levando a planta à senescência.

O sombreamento e corte/pastejo (fatores estressantes) seguem um período em que a fotossíntese por unidade de IAF aumenta em decorrência da adaptação das folhas sombreadas ou velhas (remanescentes) a maior intensidade de luz e da produção de novas folhas (Da Silva & Pedreira, 1997). Porém, segundo afirmaram Corsi & Nascimento Junior (1994), os carboidratos produzidos antes do sombreamento ou corte são armazenados na base do colmo e, ou raízes, quando há excesso de produção fotossintética. Assim, esses carboidratos passam a ser utilizados pela planta após a desfolhação para auxiliar na reconstituição de sua área foliar.

Desse modo a área foliar remanescente após desfolhação assume grande importância por aumentar o vigor da rebrotação, resultado da imediata produção de

carboidratos pela fotossíntese, fato que proporciona à planta menor tempo de dependência dos carboidratos de reserva como fonte de energia para a sua recuperação. Nesse contexto, para rápida recuperação do dossel pós pastejo, deve-se observar a restauração das reservas orgânicas, a área foliar residual (Brougham, 1956), a interceptação luminosa pelo dossel, as perdas por senescência e respiração (Parsons et al., 1983) e o número de folhas vivas por perfilho (Fulkerson & Slack, 1994).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, A.G. Sugarcane physiology. Amsterdam: **Elsevier**, v. 1, p.752-759. 1973.

ANDRADE, C. M. S. Importância das leguminosas para a sustentabilidade dos sistemas de produção de ruminantes. In: MACEDO JR., G.; SANTOS, M. E. R.; BARBERO, L. et al. (Org.). **Simpósio brasileiro de produção de ruminantes no cerrado: sustentabilidade do sistema produtivo**. 1. Ed. Uberlândia, MG: UFU. v.1, p. 11-28, 2012.

ANDRADE, M. S. A.; GARCIA, R.; COUTO, L. et al. Desempenho de seis gramíneas solteiras ou consorciadas com *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e Eucalipto em sistema silvipastoril. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1845-1850, 2003.
APHALO, P.J.; BALLARÉ, C.L. On the importance of acquiring systems in plant–plant interactions. **Functional Ecology**, v. 9, n. 1, p. 5–14, 1995.

BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G.B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.51-67, 2008. Supl.

BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. V.40, p.95-117, 1989.

BERNARDINO, F. S.; GARCIA, R. Sistemas Silvipastoris. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.60, p.77-87, 2009.

BETTIOL, J. V. T.; PEDRINHO, A.; MERLOTI, L. F.; BOSSOLANI, J. W.; SÁ, M. E. cover crops, using single and intercropping with leguminous urochloa ruziziensis and its effects on the seed yield of common bean. **Uniciências**, v.19, n.1, p.3-10, 2015.

BOIN, C. Produção animal em pastos adubados. In: MATTOS, H.B.; WERNER, J.C.; YAMADA, T.; MALAVOLTA, E. (Ed.). Calagem e Adubação de Pastagens. Piracicaba: **Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e Fósforo**, 1986. p. 383-419.

BRAGA, G.J.; PEDREIRA, C.G.S; HERLING, V.R.; LUZ, P.H.D.; DE LIMA, U.G. Sward structure and herbage yield of rotationally stocked pastures of ‘Marandu’ palisadegrass [*Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf] as affected by herbage allowance. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 63, n. 2, p. 121-129, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000200003>.

BRIEN, R. O.; FOWKES, N. Modification patterns in germinating barley—malting II. **Journal of Theoretical Biology**, v. 23, p. 315-325, 2005.

BROUGHAM, R.W. Effect of intensity of defoliation on regrowth of pasture. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, v. 7, n. 5, p. 377-387, 1956. <https://doi.org/10.1071/AR9560377>.

CARVALHO, M.M. Contribuição dos sistemas silvipastoris para a sustentabilidade da atividade leiteira. In: Simpósio sobre sustentabilidade de sistemas de produção de leite a pasto e em confinamento, 2001, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2001. p.85-108.

CARVALHO, M.M.; FREITAS, V.P.; XAVIER, D.F. Início de florescimento, produção e valor nutritivo de gramíneas forrageiras tropicais sob condição de sombreamento natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.5, p. 717- 722, 2002.

CAVALLINI, M.C.; ANDREOTTI, M.; OLIVEIRA, L.L.; PARIZ, C.M.; CARVALHO, M. de P. e. Relações entre produtividade de *Brachiaria brizantha* e atributos físicos de um Latossolo do Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.4, p.1007-1015, 2010.

CLARK, S. C.; HAYES, P. M.; HENSON, C. A. Effects of single nucleotide polymorphisms in β -amylase1 alleles from barley on functional properties of the enzymes. **Plant physiology and biochemistry**, v. 41, p. 798-804, 2003.

CORSI, M.; NASCIMENTO JR., D. Princípios de fisiologia e morfologia de plantas forrageiras aplicados no manejo de pastagens. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. (Ed.). Pastagens: fundamentos da exploração racional. Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 15-48.

DA SILVA, S.C.; PEDREIRA, C.G.S. Princípios de ecologia aplicados ao manejo de pastagem. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMAS DE PASTAGENS, 3., 1997, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 1-62.

DÉJARDIN A., ROCHAT C., WUILLÉM S., BOUTIN J.P. Contribution of sucrose synthase. **Plant, Cell and Environment**, 1421-1430. 1997.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande, MS. ***Brachiaria brizantha* cv. Marandu- Soluções Tecnológicas**. Campo Grande, EMBRAPA -CNPGC, 2016. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos).

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Gado de Corte. **Cultivo e uso do estilosantes- Campo Grande**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2007. (Comunicado Técnico, 105).

ESCHRICH, W. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, n.93, p.363-378, 1980.

FERNADES, C.D.; GROF, B.; CHAKRABORTY, S.; VERZIIGNASS, J.R.. Estilosantes Campo grande in Brazil: a tropical forrage legumes sucess story. IN: International Grassland Congress. 2005. Proceedings... Dublin: Waglingem Academic, 2005.

FERNANDES, L.O.; REIS, R.A.; PAES, J.M.V. Efeito da suplementação no desempenho de bovinos de corte em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência & Agrotecnologia**, v.34, n.1, p.240-248, 2010.

FERREIRA, A.G. e AQUILA, E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 12, p. 175-204, 2000.

FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, v. 96, n. 2, p. 169– 175, 2005.

FULKERSON, W. J.; SLACK, K. Leaf number as a criterion for determining defoliation time for *Lolium perenne*, 1. Effect of water-soluble carbohydrate and senescence. *Grass and Forage Science*, Oxford, v. 49, n. 4, p.373-377, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1994.tb02013.x>.

GARCEZ NETO, A. F. et al. Aclimação morfológica de forrageiras temperadas a padrões e níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, n.1, p.42-50, 2010.

GAYLER, K.R.; GLASZIOU, K.T. Physiological functions of acid and neutral invertases in growth and sugar storage in sugar cane. **Plant Physiology**, v.27, p.25-31, 1972.

GIBEAUT, D.M. et al. Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheath pulvinus of oat (*Avena sativa*). **Plant Physiology**, n.94, p.411-416, 1990.

GOBBI, K. F.; GARCIA, R.; VENTRELLA, M.; GARCEZ NETO, A. F.; ROCHA, G. C.; Área foliar específica e anatomia foliar quantitativa do capim-braquiária e do amendoim-forrageiro submetidos a sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7, 2011.

GRIME, J. P. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. 2. ed. Chichester, UK: **Wiley**, 2001.

GUILHERME, F.A.G. Efeitos da cobertura de dossel na densidade e estatura de gramíneas e da regeneração natural de plantas lenhosas em mata de galeria, Brasília-DF. **Cerne**, v. 6, n.1, p. 60-66, 2000.

HAYNES, R.H. Competitive aspects of the grass-legume association. **Advances in: HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Journal Biochemistry**. V.316, n.2, p.695-696, 1996.

IRVING, D.E. Starch degradation in buttercup squash (*Cucurbita maxima*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**.v.124, n.6, p.587–590, 1999.

KELLER, F. & PHARR, D. M. Metabolismo f carbohydrates in sinks and sources. Galactosyl-Sucrose. Pp. 157-184. In: **Phptoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York, Marcel Dekker, Inc. 1996.

KEPHART, K. D. et al. Growth of C3 and C4 perennial grasses under reduced. **Crop Science**, v.32, p.1033-1038, 1992.

KOCH, K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.

LARA, M.A.S. Respostas morfofisiológicas de cinco cultivares de *Brachiaria* spp. às variações estacionais de temperatura do ar e do fotoperíodo. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LEITE, G. H. P.; Crusciol, C. A. C.; Lima, G. P. P.; Silva, M. A. Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, v.39, n.3, 2009.

LEMAIRE G., 2001. Ecophysiological of Grasslands: Dynamics aspects of forage plant population in grazed swards. **Proceedings of the XIX International Grassland Congress**, São Paulo (Brasil), n.10, v.21, p.29-37, 2001.

LEME, T.M.S.P.; PIRES, M. de F.A.; VERNEQUE, R. da S.V.; ALVIM, M.J.; AROEIRA, L.J.M. Comportamento de vacas mestiças Holandês x Zebu, em pastagem de *Brachiaria decumbens* em sistema silvipastoril. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.668-675, 2005.

LEWIS, D. H. **Stronge carbohydrates in vascular plants: distribution, physiology and metabolismo**. London, Cambridge University. 1984.

LIN, C. H.; et al. Nutritive quality and morphological development under partial shade of some forrage species with agroforestry potential. **Agroforestry Systems**, v.53, p.269-281, 2001.

LINGLE, S.E. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. **Crop Science**, v.39, p.480-486, 1999.

LOOMIS, R.S.; WILLIAMS, W.A. Productivity and the morphology of crop stands: patterns with leaves. In: EASTIN, J.D.; HASKINS, F.A.; SULLIVAN, C.Y. et al. (Eds.). *Physiological aspects of crop yield*, 1969. p. 27-47.

MILTHORPE, F.L.; DAVIDSON, J.L. Physiological aspects of regrowth in grasses. In: MILTHORPE, F.L.; IVINS (Eds.) *The growth of cereals and grasses*, 1966, p. 241-254.

MIRANDA, C.H.B.; ZANELA, C.; SCHUNKE, R.M. Competições entre espécies nas consorciações de *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema aculifolium* e *Brachiaria decumbens*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 6, 851-856, 1992.

MOHAN, B.H.; GOPAL, A.; MALLESHI, N.G.; THARANATHAN, R.N. Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed ragi (*Eleusine coracana*) and rice (*Oryza sativa*) starches. **Carbohydrate polymers**, v.59, p.43-50, 2005.

MORENO, L.S.B. Produção de forragem de capins do gênero *Panicum* e modelagens de respostas produtivas e morfofisiológicas em função de variáveis climáticas. 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

NAKAI, T., TONOUCI N., KONISHI T., TSUCHIDA T., YOSHINAGA F., SAKAI F., HAYASHI T., Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**. p. 14-18, 1999.

PACIULLO, D.S.C.; et al. Morfologia e valor nutritivo do capim-braquiária sob sombreamento natural e a sol pleno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.573-579, 2007.

PACIULLO, D.S.C.; GOMIDE, A.M.; CASTRO, C.R.T.; FERNANDES, P. B.; MÜLLER, M.D.; PIRES, M.F.A.; FERNANDES, E.N.; XAVIER, D.F. Características produtivas e nutricionais do pasto em sistemas agrossilvipastoril, conforme a distância das árvores. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.46, n.10, p.1176-1183, 2011.

PARK, S.A.; BENJAMIN, R.L.; WATKINSON, A.R. The theory and application of plant competition models: an agronomic perspective. **Ecology**. v. 82, n. 9, p. 2525 -2535, 2001.

PARSONS, A.J.; LEAFE, E.L.; COLLETT, B.; PENNING, P.D.; LEWIS, J. The physiology of grass production under grazing. II. Photosynthesis, crop growth and animal intake of continuously-grazed swards. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v. 20, p. 127-139. 1983. <https://doi.org/10.2307/2403381>.

PAULINO, V. T.; COLOZZA, M. T.; OTSUK, I. P. Respostas de *Stylosanthes capitata* Vogel à aplicação de nutrientes e doses de calcário em solo de cerrado. **Boletim de Indústria Animal**, v. 65, n. 4, p. 275-281, 2008.

PEQUENO, D.N.L. Intensidade de pastejo como condicionante da estrutura do dossel e da assimilação de carbono de pastos de capim Xaraés [*Brachiaria brizantha* (A. Rich) Stapf. cv. Xaraés] sob lotação contínua. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência 33 Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PEREIRA, M.M; REZENDE, C.P; PEDREIRA, M.S; PEREIRA, J.M; MACEDO, T.M; SILVA, H.G.O; BORGES, A.M.F; SILVA, A.M.P. Valor alimentício do capim marandu, adubado ou consorciado com amendoim forrageiro, e características da carcaça de bovinos de corte submetido à pastejo rotacionado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.16, n.3, p.643-657, 2015.

POORTER, H.; NAVAS, M.L. Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. **New Phytologist**. v. 157, p. 157-198, 2003.

PREISS, J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. **Annual Review Plant Physiology**. V.33, p.431-454, 1982.

PUJADAS, G., PALAU, J. Evolution of α -amylases: Architectural features and key residues in the stabilization of the $(\beta/\alpha)_8$ scaffold. **Molecular Biology and Evolution**. V.18, n.1, p.38-54, 2001.

RAYMAN, P.R. Minha experiência com *Brachiaria brizantha*. Campo Grande, **Rayman's Seeds Sementes de Pastagens Tropicais**, 1983. 3p.

ROHWER, J.M.; BOTHA, F.C. Analysis of sucrose accumulation in the sugarcane culm on the basis of in vitro kinetic data. **Biochemistry Journal**, v.358, p.437-445, 2001.

ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, v.9, n.12, 2004.

SAIKA, H.; NAKAZONO, M.; IKEDA, A.; YAMAGUCHI, J.; MASAKI, S.; KANEKATSU, M., NEMOTO, K. A transposon-induced spontaneous mutation results in low α - and β -amylase content in rice. **Plant science**, v.169, p.239-244, 2005.

SÁNCHEZ, S.; HERNÁNDEZ, M.; SIMÓN, L. Efecto del sistema silvopastoril en la fertilidad edáfica en unidades lecheras de la empresa Nazareno. **Pastos y Forrajes**, v.26, p.131-136, 2003.

SANTOS, M. E. R. et al. Capim-braquiária diferido e adubado com Nitrogênio: Produção e Funcionalidades da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, n.4, p. 650-656, 2009.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M., MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. **Process Chemistry**. V.35, n.7, p.711-715, 2000.

SKONIESKI, F.R.; VIÉGAS, J.; BERMUDEZ, R.F. Composição botânica, estrutural e valor nutritivo de pastagens de azevém consorciadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.40, n.6, p.550-556, 2011.

SOUSA, L.F.; MAURÍCIO, R.M.; GONÇALVES, L.C.; SALIBA, E.O.S.; MOREIRA, G.R. Produtividade e valor nutritivo da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em um sistema silvipastoril. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1029-1037, 2007.

SOUSA, L.F.; MAURÍCIO, R.M.; MOREIRA, G.R.; GONÇALVES, L.C.; BORGES, I.; PEREIRA, L.G.R. Nutritional evaluation of “Braquiaraão” grass in association with “Aroeira” trees in a silvopastoral system. **Agroforestry Systems**, v.79, p.189-199, 2011.

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MAIOMONI-RODELLA, R.C.S. efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, v.21, n.3, p.343-354, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2013.

TERAUCHI, T. et al. Activity of sucrose phosphate synthase in relation to sucrose concentration in sugarcane internodes. **Journal Tropical Agriculture**, v.44, n.3, p.141-151, 2000.

TYMOWSKA-LALANE, Z.; KREIS, M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. **Advance Botanical Research**, v.28, p.71-117, 1998.

VALLS, J.F.M.; SENDULSKY, T. Descrição botânica. In: VALLS, J.F.M. Carta, 6 de julho de 1984. **Brasília, para Saladino G. Nunes**. Campo Grande, MS. p.4-6.

VARELLA, A. C, et al. Do light and alfafa responses to cloth na slatted shade represent those measured under in agroforestry system? **Agroforestry Systems**, v.20, p.1-17, 2010.

WINTER H., HUBER S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Science**, p. 31- 67. 2000.

Zanine, A. de M.; Santos, E. M. Competição entre espécies de plantas – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. Uruguaiana, v.11, n.1, p. 10-30. 2004.

ZELITCH, I. The close relationship between net photosynthesis and crop yield. **BioScience**, v.32, p.796-802, 1982. <https://doi.org/10.2307/1308973>.

ZHU, Y.J. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. **Plant Physiology**, v.115, p.609-616, 1997.

II – OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

Avaliar o metabolismo de carboidratos de plantas forrageiras tropicais, sob diferentes níveis de sombreamento e adubção.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade de invertases e amilases em Capim Marandú sob diferentes níveis de sombreamento e adubação nitrogenada.

Avaliar a atividade enzimática de invertases e amilases de Estilosantes Campo Grande sob diferentes níveis de sombreamento e na presença ou ausência de adubação fosfatada.

Avaliar a atividade das invertases em plantas de Estilosantes Campo Grande, sob influência do sistema de cultivo e adubação nitrogenada, em duas estações do ano.

III – CAPÍTULO I
ATIVIDADE DE INVERTASES E AMILASES EM CAPIM
MARANDÚ SOB SOBREAMENTO E ADUBAÇÃO
NITROGENADA

RESUMO – Objetivou-se avaliar a atividade de invertases e amilases em Capim Marandú sob diferentes níveis de sombreamento e adubação nitrogenada. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em um esquema fatorial 4x2 (níveis de sombreamento 0%, 30%, 50% e 80% e adubação nitrogenada 0 e 100 kg N.ha⁻¹). Foi avaliada a atividade das enzimas, invertase neutra do citossol (INC), ácida do vacúolo (IAV) e ácida da parede celular (IAPC), os teores de açúcares redutores e atividade das enzimas α e β -amilases, nas folhas, caules e raízes. Adotou-se $\alpha = 0,05$. A interação foi significativa para a atividade da INC na folha, tanto no 1º quanto no 2º ciclo. No 1º ciclo, a maior atividade foi observada quando as plantas foram adubadas, nos sombreamentos com 30, 50 e 80%. Assim como IAPC para os dois ciclos, sendo 1º ciclo, a maior atividade nos sombreamentos 0, 30 e 50% quando as plantas foram adubadas. No entanto, a interação não foi significativa para a atividade da IAV na folha, tanto no 1º quanto no 2º ciclo. A maior atividade da IAV foi observada nas plantas adubadas. A atividade da α -amilase no caule apresentou interação significativa apenas no 2º ciclo. Enquanto na raiz houve interação significativa, onde à pleno sol, a ausência de adubação promoveu maior atividade dessa enzima. Enquanto a 30 e 50% as maiores atividades foram observadas na presença de adubação. A β -amilase no caule apresentou interação significativa apenas no 2º ciclo, onde em 80% de sombreamento, a adubação favoreceu a atividade. Enquanto na raiz, não apresentou interação. Conclui-se que a adubação aumenta a atividade enzimática. As invertases aumentam atividade quando sombreadas de 30 a 50% e em pleno sol, está diretamente ligada ao sistema osmorregulador. A redução AR está relacionada a baixa taxa fotossintética e o aumento α e β -amilase está associada a utilização das fontes de reservas para suprir as necessidades energéticas.

ACTIVITY OF INVERTASES AND AMILASES IN CAPIM MARANDÚ UNDER SHADING AND NITROGEN FERTILIZATION

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the activity of invertases and amylases in Capim Marandú under different levels of shading and nitrogen fertilization. The experiment was carried out in greenhouse, in a 4x2 factorial scheme (0%, 30%, 50% and 80% shading levels and nitrogen fertilization 0 and 100 kg N.ha⁻¹). The activity of the enzymes, cytosol-neutral invertase (Inv-N), vacuole acid (Inv-V) and cell-acid-acidity (Inv-CW) were determined, the levels of reducing sugars and the activity of α and β -amylases in leaves, stems and roots. A = 0.05 was used. The interaction was significant for the Inv-N activity on the leaf, both in the 1st and 2nd cycles. In the 1st cycle, the highest activity was observed when the plants were fertilized, in the shading with 30, 50 and 80%. As the Inv-CW for the two cycles, being the first cycle, the highest activity in the 0, 30 and 50% shading, when the plants were fertilized. However, the interaction was not significant for Inv-V activity in the leaf, both in the 1st and 2nd cycles. The highest activity of the Inv-V was observed in the fertilized plants. The α -amylase activity in the stem showed significant interaction only in the 2nd cycle. While at the root, there was a significant interaction, where at full sun, the absence of fertilization promoted greater activity of this enzyme, while at 30 and 50% the highest activities were observed in the presence of fertilization. The β -amylase in the stem showed significant interaction only in the 2nd cycle, where in 80% of shading, fertilization favored the activity. While in the root, no interaction. It is concluded that the fertilization increases the enzymatic activity. The invertases increase activity when shaded from 30 to 50% and in full sun, is directly linked to the osmoregulatory system. The RS reduction is related to low photosynthetic rate and the increase α and β -amylase is associated with the use of the sources of reserves to meet the energetic needs.

Key words: carbohydrates, photosynthesis, invertases

INTRODUÇÃO

As braquiárias são seres fotoautótrofos, portanto dependem da aquisição de energia luminosa para o crescimento e persistência quando a planta está sob ameaça de sobrevivência devido a limitações de luz, mecanismos evolutivos direcionam estratégias adaptativas altamente plásticas para tolerar ou escapar do sombreamento causado pela vegetação vizinha (Franklin & Whitelam, 2005). Por conta disso, as plantas estão continuamente ajustando seu metabolismo, desenvolvendo estratégias para crescimento e desenvolvimento, a fim de otimizar a atividade fotossintética frente a competição por luz.

O mecanismo do acúmulo ativo de sacarose é dependente da maturidade dos tecidos, isto é, há diferença entre tecidos maduros e imaturos devido, principalmente, à concentração de invertases e à necessidade de crescimento (Alexander, 1973).

A degradação da sacarose, e conseqüentemente, o estabelecimento do dreno, pode ser realizada tanto pela sacarose sintase (SuSy) quanto pela invertase (Taiz & Zeiger, 2013). As enzimas invertases nas forrageiras são encontradas em diversas isoformas, com diferentes propriedades bioquímicas e localização subcelular, isto é, invertase neutra, invertase ácida vacuolar e invertase ácida de parede celular (Tymowska-Lalanne e Kreis, 1998; Rohwer; Botha, 2001).

Dessa forma, a constituição do espaço forrageiro engloba tanto o aspecto morfológico e estrutural quanto a bioquímica e fisiologia das plantas cultivadas. A interação dos fatores bióticos e abióticos refletem nas respostas aos diferentes estímulos, podendo alterar o metabolismo de carboidratos e a partição dos fotoassimilados em diferentes estádios de desenvolvimento.

Diante disso, visou-se avaliar a atividade de invertases e amilases em Capim Marandú sob diferentes níveis de sombreamento e adubação nitrogenada.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e condução do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação no período de 01 de julho a 09 de novembro de 2016, localizada na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus “Juvino Oliveira”, na cidade de Itapetinga, BA, situada nas seguintes coordenadas: 15°38’46” de latitude sul, 40°15’24” de longitude oeste e altitude média de 280 m, no município de Itapetinga, BA. O clima do município, de acordo com a classificação köppen, é do tipo “Cw”, mesotérmico úmido e sub-úmido quente.

O ensaio foi conduzido em um esquema fatorial 4 x 2, com quatro repetições, sendo 4 níveis de sombreamento (0%, 30%, 50% e 80% de sombreamento) e com e sem adubação nitrogenada de 100 kg N.ha⁻¹, em um delineamento em blocos ao acaso, totalizando 32 vasos plásticos com capacidade para 10 dm³ e um período experimental de 84 dias.

O solo utilizado foi coletado na Fazenda Bela Vista, localizada no município de Encruzilhada, BA, sendo classificado como latossolo vermelho escuro, com textura franco argilo arenosa. Para análise de solo, amostras simples foram coletadas em pontos aleatórios com a profundidade de 0-20 cm, secas ao ar, homogeneizadas para se obter a amostra composta, em seguida enviada ao Departamento de Engenharia Agrícola e Solos da UESB para a realização de análises químicas, descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo

pH	*mg/dm ³	*cmol _c /dm ³ de solo.....										%	g/dm ³
(H ₂ O)	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺	Na ⁺	S.B ¹	t ²	T ³	V ⁴	m ⁵	M.O. ⁶
5,1	2	0,30	1,7	1,3	0,4	4,3	-	3,3	3,7	8,0	41	11	25

¹Soma de bases. ²CTC efetiva. ³CTC pH 7. ⁴Saturação por bases. ⁵Saturação por Al³⁺. ⁶Matéria orgânica. Fonte: Laboratório de solos da UESB.

Conforme os resultados da análise de solo e seguindo as recomendações da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (Alvarez & Ribeiro, 1999), onde foi adotado o nível médio tecnológico, houve a necessidade de realizar a calagem, considerando a baixa relação cálcio/magnésio e para elevar a saturação de bases para 50, foi aplicado calcário calcítico 30 dias antes do transplante das mudas, na quantidade de 4,8 g por vaso e a adubação fosfatada, realizada no momento do plantio, com 90 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, que equivale a 1,3 g de superfosfato triplo por vaso. A adubação nitrogenada foi realizada de forma parcelada em duas vezes, em um total de 100 kg de nitrogênio por hectare, que corresponde a 1,8 g de ureia por vaso.

Para determinação da capacidade de campo, os vasos com solo seco foram pesados, sendo encharcados e pesados novamente após o escoamento total da água. Pela diferença de peso seco e molhado, foi determinada a máxima capacidade de retenção de água, a qual foi em torno de 18%.

O plantio foi realizado em 01 de julho de 2016 em vasos para produção de mudas, usando sementes de Capim Marandú vendidas comercialmente e foram transplantadas em 15 de julho, em um número de dez mudas para cada vaso experimental. Após 15 dias, foi feito o desbaste restando quatro plântulas por vaso.

No dia 16 de agosto, foi realizado o corte de uniformização na altura de 10 cm do solo e implantação das telas para o sombreamento. O sentido de posição das telas de náilon foi leste-oeste. Os percentuais de sombreamento utilizados foram de 0, 30, 50 e 80%, de acordo com o fabricante.

As plantas foram irrigadas diariamente, mantendo a capacidade de campo durante o período experimental. As temperaturas e umidades mínimas, máximas e médias foram aferidas durante o período experimental, que compreende da data de 16 de agosto a 09 de novembro de 2016, totalizando 84 dias. Figura 1.

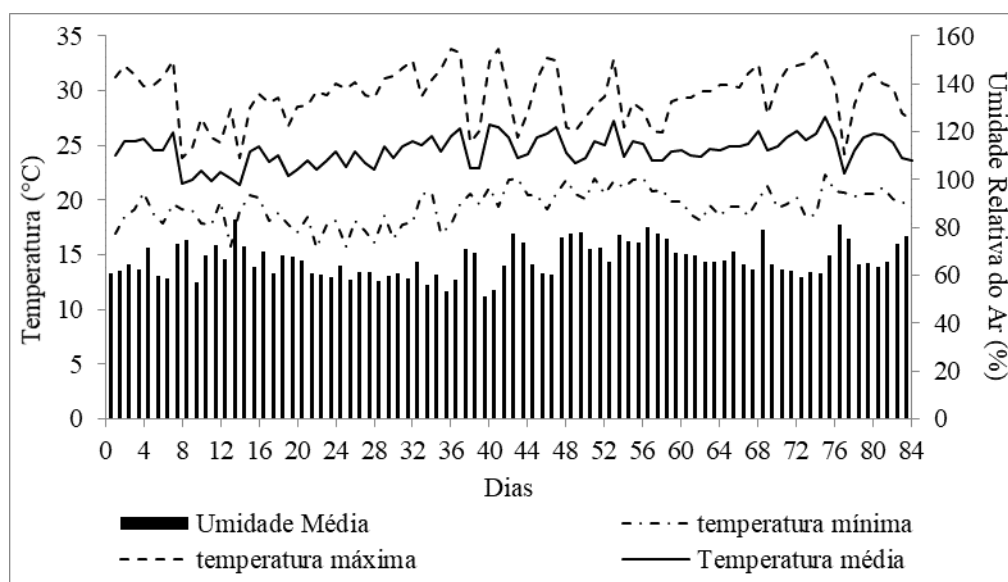


Figura 1: Temperaturas máxima, média e mínima e Umidade Relativa do Ar durante o período de 16 de agosto a 09 de novembro de 2017.

As coletas para as análises enzimáticas foram realizadas em dois ciclos, 13 de setembro e 09 de novembro, que correspondem a 28 após o corte de uniformização e 28 dias após o segundo corte, a 15 cm de altura. Foram coletadas a terceira ou quarta folha completamente expandida, o caule e a raiz das plantas ao final do segundo período quando

os vasos foram desmanchados. No momento das coletas, o material vegetal foi alocado em sacos papel alumínio, previamente identificados e posteriormente imersos em nitrogênio líquido para cessar a atividade enzimática. Todo material foi armazenado em freezer a -80°C para em seguida, serem feitas as análises da atividade enzimática.

Avaliações de Atividade Enzimática

Extração e Incubação das Invertases

A extração e incubação das invertases solúveis, invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase neutra do citossol (INC) foram realizadas conforme descrito por Zeng et al (1999), e as invertases insolúveis, invertase ácida da parede celular (IAPC), segundo Cazetta et al. (1999), ambas modificadas por Fries et al. (2003).

A IAV e INC foram extraídas pela homogeneização de 250 mg de massa fresca de folha, caule e raiz, maceradas em cadinho de porcelana sobre o gelo, com 1,8 mL do tampão de extração contendo 100mM de fosfato de potássio (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 20 mM de ácido ascórbico, seguido pela centrifugação a 9.000 g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado para incubação da IAV e INC.

Para a extração da IAPC, o pellet foi ressuspenso e homogeneizado com 1 mL do seguinte tampão: 200 mM citrato de sódio (pH 4,8), 5 mM MgCl₂, 20 mM de ácido ascórbico, 1 M NaCl. Em seguida, realizou-se uma nova centrifugação a 9.000 g por 20 minutos e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado para incubação da IAPC.

A atividade das enzimas foi realizada em tampão contendo 100mM de fosfato de potássio (pH 7,5), 0,5 mM MgCl₂, para INC e tampão contendo 200mM de citrato de sódio (pH 4,8), 0,5 mM MgCl₂, para IAV e IAPC, ambos acrescidos de 200 mM de sacarose, sendo utilizado um volume de 600 µL por incubação.

A incubação foi realizada nos tempos zero (T0) e sessenta minutos (T60). Para o T0, 200 µL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e a reação, imediatamente, foi paralisada em gelo. Reações há 0 minutos foram determinadas para eliminar os açúcares redutores pré-existentes. Para o T60, 200 µL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e incubação em banho-maria, a 30°C, por 60 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada em gelo.

Quantificação das invertases

As enzimas foram quantificadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se curva padrão de glicose e pelo método do ácido 3,5-

dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). A atividade das enzimas foi obtida pela diferença dos valores após 60 minutos de incubação daqueles T0. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram obtidos a partir do extrato das invertases solúveis, no tempo 0. A quantificação foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se curva padrão de glicose e pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959).

Extração e Incubação de α e β -amilase

A extração e incubação das amilases, α e β foram realizadas como descritas por Skadsen (1993), modificado por Fries et al., (2003).

A α e β -amilases foram extraídas pela homogeneização de 250 mg de massa fresca do caule e raiz, maceradas em cadinho de porcelana sobre o gelo, com 2 mL do tampão de extração contendo 200 mM de fosfato de potássio (pH 5,5), 20 mM ácido ascórbico, seguido pela centrifugação a 9.000 g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado em tubos separados, sendo metade para α -amilase e metade para β -amilase. Os tubos identificados para avaliação da α -amilase foram colocados em banho-maria a 70°C por 20 minutos, a fim de inibir a ação da β -amilase. Posteriormente, todos os tubos foram mantidos em gelo até a incubação.

A atividade das enzimas foi realizada em tampão contendo acetato de potássio 200 mM (pH 5,5), 5 mM de CaCl_2 e 1% de amido solúvel, para α amilase e tampão contendo acetato de potássio 200 mM (pH 5,5) e 1% de amido solúvel para β -amilase, sendo utilizado um volume final de 400 μL para ambas.

A incubação foi realizada nos tempos zero (T0) e sessenta minutos (T60). Para o T0, 100 μL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e a reação, imediatamente, foi paralisada em gelo. Para o T60, 100 μL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e incubação em banho-maria, a 30°C, por 60 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada em gelo.

Quantificação de α e β -amilase

As enzimas foram quantificadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se curva padrão de glicose e pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). A atividade das enzimas foi obtida

pela diferença dos valores após 60 minutos de incubação daqueles T0. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância, considerando como fontes de variação, o efeito da adubação nitrogenada (0 e 100 kg.ha^{-1}), o efeito do sombreamento (0, 30, 50 e 80% de sombreamento), a interação adubação nitrogenada e sombreamento. A interação foi desdobrada, ou não, de acordo com a significância. O efeito do nitrogênio foi estudado por meio do teste F e o efeito do sombreamento por meio da análise de regressão onde os coeficientes foram testados pelo t. Adotou-se $\alpha= 0,05$ (SAS, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada foi significativa ($P < 0,05$) para a atividade da INC na folha, tanto no 1º quanto no 2º ciclo. No 1º ciclo, a maior atividade enzimática foi observada quando as plantas foram adubadas com 100 kg N.ha^{-1} , nos sombreamentos com 30, 50 e 80%. Entretanto à pleno sol, ou 0% de sombreamento, não houveram diferenças entre a atividade enzimática as plantas adubadas ou não ($P > 0,05$). O sombreamento influenciou em um efeito quadrático na INC quando as plantas foram adubadas, apresentando atividade enzimática máxima de $190,37 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 53,31% de sombreamento. Já na ausência de adubação, a atividade média foi de $61,62 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Tabela 2).

No segundo ciclo, à pleno sol, a maior atividade da INC na folha foi observada quando as plantas foram adubadas. No entanto, nos demais sombreamentos não diferiram. O sombreamento influenciou de forma quadrática quando as plantas foram adubadas ou não. Na ausência de adubação, máxima atividade da INC foi de $80,31 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 64,67% de sombreamento, enquanto as plantas adubadas, a máxima foi de $87,33 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 36,43% de sombreamento.

A interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada não foi significativa ($P > 0,05$) para a atividade da IAV na folha, tanto no 1º quanto no 2º ciclo. Para ambos os ciclos, a maior atividade da IAV na folha foi observada quando as plantas foram adubadas. No primeiro ciclo, o sombreamento apresentou um efeito quadrático com máxima atividade enzimática de $164,98 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 55,32% de sombra. No entanto, no segundo ciclo, o sombreamento não diferiu, apresentando uma atividade enzimática média de $97,87 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Tabela 2. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folha de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois ciclos distintos

	Adubação ¹	Sombreamentos				Média	CV ²	Equações	R ²
		0	30	50	80				
INC³									
1 ^a ciclo	0	53,85 a	88,87 b	53,04 b	50,71 b	61,62	28,27	$\hat{Y}_0=61,62$ $\hat{Y}_{100}= 99,416+3,412x-0,032x^2$	0,92
	100	95,90 a	187,07 a	176,07 a	171,33 a	157,59			
	Média	74,88	137,97	114,55	111,02	109,60			
2 ^a ciclo	0	19,71 b	59,13 a	80,80 a	76,27 a	58,98	23,52	$\hat{Y}_0=18,822+1,9014x-0,0147x^2$ $\hat{Y}_{100}= 69,946+0,9545x-0,0131x^2$	0,98 0,87
	100	71,34 a	81,22 a	90,56 a	61,20 a	76,08			
	Média	45,53	70,18	85,68	68,73	67,53			
IAV³									
1 ^a ciclo	0	42,67	159,26	97,44	153,25	113,16 b	34,82	$\hat{Y}_x=84,169+2,9212x-0,0264x^2$	0,60
	100	108,33	206,10	161,42	161,30	159,29 a			
	Média	75,50	182,68	129,43	157,28	136,22			
2 ^a ciclo	0	70,44	86,75	65,11	59,70	70,50 b	24,02	$\hat{Y}_x=97,87$	
	100	122,38	165,84	126,10	86,67	125,25 a			
	Média	96,41	126,29	95,60	73,18	97,87			
IAPC³									
1 ^a ciclo	0	26,11 b	11,80 b	20,39 b	55,13 a	28,36	26,84	$\hat{Y}_0= 25,95-0,9411x+0,0163x^2$ $\hat{Y}_{100}= 59,503-0,3632x$	0,99 0,64
	100	59,27 a	41,04 a	54,56 a	25,02 b	44,97			
	Média	42,69	26,42	37,47	40,08	36,67			
2 ^a ciclo	0	9,99 b	29,36 a	29,13 a	25,18 a	23,41	41,50	$\hat{Y}_0=10,468+0,7966x-0,0078x^2$ $\hat{Y}_{100}=19,227+0,518x-0,008x^2$	0,96 0,46
	100	16,63 a	37,96 a	14,72 a	12,01 a	20,33			
	Média	13,31	33,66	21,92	18,60	21,87			

¹kg N.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

A interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada foi significativa ($P < 0,05$) para a atividade da IAPC na folha, para os dois ciclos. No primeiro ciclo, a maior atividade enzimática foi observada nos sombreamentos 0, 30 e 50% quando as plantas foram adubadas. No entanto, a 80% de sombreamento, a maior atividade foi observada nas plantas que não receberam adubação. O sombreamento influenciou de forma quadrática na atividade enzimáticas das plantas que não receberam adubação, com mínima atividade de $12,36 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 28,87% de sombreamento. Quando as plantas foram adubadas, apresentou um efeito linear decrescente, reduzindo gradativamente a atividade da enzima à medida que o sombreamento aumenta.

No segundo ciclo, à pleno sol, a maior atividade da IAPC na folha foi observada quando as plantas foram adubadas. No entanto, nos demais sombreamentos não diferiram. O sombreamento apresentou efeito quadrático para a atividade da IAPC nas plantas adubadas e não adubadas. Na ausência de adubação, a máxima atividade enzimática foi de $30,80 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 51,06% de sombreamento. Enquanto nas plantas que foram adubadas, a máxima foi de $27,61 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 32,37% de sombreamento.

Em geral, a adubação nitrogenada favoreceu a maior atividade das enzimas invertases, pois o efeito do aporte de nitrogênio sobre o crescimento das plantas, reflete diretamente no seu metabolismo, aumentando o requerimento de energia para o desenvolvimento e expansão celular. Nos cloplastos e pigmentos fotossintetizantes, a presença do nitrogênio é essencial. Este mineral participa da constituição das clorofilas *a* e *b*. Na primeira etapa da fotossíntese, ocorre a absorção de luz por uma molécula fotoceptora. O principal fotorreceptor nos cloroplastos é a clorofila, onde quatro átomos de nitrogênio dos pirróis são coordenados a um átomo de magnésio (Taiz et al, 2017). Deste modo, a adubação nitrogenada favorece a maior disponibilidade desse nutriente para a planta, que sugere em uma maior condição para realização da fotossíntese e produção de fotoassimilados.

A expansão celular dos tecidos imaturos requer hexoses como fonte de energia e carbono e depende da direção da força de alongamento celular, consequência da manutenção da pressão osmótica e do aumento da extensibilidade da parede celular. Portanto, diversos estudos evidenciam a atuação das invertases ácidas no processo de osmorregulação (Gayler & Glasziou, 1972; Gibeaut et al., 1990). Sendo assim, os sombreamentos entre 30 e 50% permitiram a máxima atividade das invertases, atuando na degradação da sacarose para utilização nos sítios de maior necessidade e criando um

gradiente de concentração entre diferentes sítios descarregamento dos carboidratos, via floema.

A interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada foi significativa ($P < 0,05$) para a atividade enzimática da INC no caule, no 1º e 2º ciclo. No primeiro ciclo, em pleno sol e 30% de sombreamento, houve maior atividade da INC no caule das plantas que receberam adubação, enquanto que com 50 e 80% de sombreamento, não diferiu quanto adubação. O sombreamento apresentou efeito quadrático da INC nas plantas que receberam adubação, com mínima atividade de $97,40 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 34,58% de sombreamento. E nas plantas não adubadas, o sombreamento não diferiu, apresentando atividade média de $57,10 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Tabela 3).

No segundo ciclo, com 50 e 80% de sombreamento, foi observada a maior atividade da INC quando as plantas foram adubadas. O sombreamento apresentou efeito quadrático da INC nas plantas adubadas e não adubadas. Na ausência de adubação, a mínima atividade foi de $32,39 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 27,07% sombreamento, e na presença de adubação, a mínima atividade foi de $49,51 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 26,87% de sombreamento.

A interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada foi significativa ($P < 0,05$) para a atividade enzimática da IAV no caule apenas no primeiro ciclo. A maior atividade da IAV foi observada nas plantas que foram adubadas em todos os níveis de sombreamento (0, 30, 50 e 80%). Nas plantas não adubadas, o sombreamento não diferiu, apresentando atividade média de $76,13 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No entanto, a atividade enzimática nas plantas que foram adubadas apresentou um efeito linear decrescente, reduzindo gradativamente a atividade da enzima, à medida que o sombreamento aumenta. No segundo ciclo, não houve interação significativa, e a adubação e o sombreamento não diferiram, apresentando atividade média de $67,30 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada não foi significativa ($P > 0,05$) para a atividade enzimática da IAPC no caule e a adubação e o sombreamento não difeririam, nos dois ciclos, apresentando atividade média de $40,01 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no primeiro ciclo e $24,64 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no segundo ciclo.

Tabela 3. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em caule de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois períodos distintos

	Adubação ¹	Sombreamentos				Média	CV ²	Equações	R ²
		0	30	50	80				
INC ³									
1º ciclo	0	48,23 b	59,11 b	61,01 a	60,04 a	57,10	33,76	$\hat{Y}_0=57,10$ $\hat{Y}_{100}= 100,51-0,1798x+0,0026x^2$	0,75
	100	98,23 a	101,86 a	75,88 a	71,66 a	86,91			
	Média	73,23	80,48	68,44	65,85	72,00			
2º ciclo	0	41,46 a	40,48 a	32,37 b	76,68 b	47,75	23,36	$\hat{Y}_0= 43,453-0,8173x+0,0151x^2$ $\hat{Y}_{100}= 73,055-1,7521x+0,0326x^2$	0,88 0,99
	100	74,31 a	44,86 a	72,07 a	140,55 a	82,94			
	Média	57,89	42,67	52,22	108,61	65,35			
IAV ³									
1º ciclo	0	60,42 b	76,09 b	78,15 b	89,86 b	76,13	44,65	$\hat{Y}_0=76,13$ $\hat{Y}_{100}=219,19-0,8241x$	0,88
	100	228,69 a	182,72 a	172,21 a	161,27 a	186,22			
	Média	144,56	129,41	125,18	125,56	131,18			
2º ciclo	0	61,40	65,90	76,21	53,58	64,27 a	43,55	$\hat{Y}_x=67,30$	
	100	57,47	106,70	58,39	58,77	70,33 a			
	Média	59,44	86,30	67,30	56,17	67,30			
IAPC ³									
1º ciclo	0	46,79	39,88	39,97	22,95	37,40 a	43,11		
	100	37,09	60,56	43,23	29,60	42,62 a			
	Média	41,94	50,22	41,60	26,28	40,01			
2º ciclo	0	16,81	27,15	23,10	21,19	22,06 a	50,78		
	100	36,21	31,45	24,17	17,08	27,23 a			
	Média	26,51	29,30	23,63	19,14	24,64			

¹kg N.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

A invertase citoplasmática está envolvida diretamente na degradação da sacarose no caule e em tecidos em já expandidos. Em pleno sol e ausência de adubação, a maior atividade dessa enzima está relacionada à regulação osmótica, isto porque as plantas estão em contato direto com o sol, o que causa um aumento da taxa de transpiração e fotossíntese, podendo ter perdas elevadas de água, uma vez que os estômatos se encontram abertos.

No entanto, com o aumento do sombreamento associados à adubação nitrogenada, pode ocorrer a competição entre as plantas consorciadas ou mesmo entre plantas da mesma espécie, uma vez que o nitrogênio influencia positivamente o crescimento das plantas. Dessa forma, a alta atividade enzimática tem como efeito o suprimento da necessidade energética das plantas com a degradação da sacarose, uma vez que a área fotossintética ativa foi reduzida devido ao sombreamento, ou mesmo para o alongamento de caule e expansão das folhas em busca de radiação solar.

De modo geral, no caule, a enzima de maior atividade foi a invertase neutra do citosol (INC) em relação as demais invertases (IAV e IAPC). Essa maior atividade está diretamente relacionada com a osmorregulação e expansão do caule.

De acordo com Lingle (1999), nos tecidos maduros do caule, onde os processos de crescimento estão praticamente finalizados, concomitante com o declínio da concentração das invertases ácidas, a invertase neutra torna-se predominante, situando-se aparentemente no citoplasma. A atividade dessa enzima, mesmo com o baixo teor, cerca de 15 a 20% em relação as invertases totais, proporciona o armazenamento de sacarose nos espaços intercelulares.

A interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada não foi significativa ($P > 0,05$) para a atividade da INC na raiz, a adubação e o sombreamento não difeririam, apresentando atividade média de $22,25 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Assim como ocorreu na atividade da IAPC na raiz, apresentando valor médio de $14,26 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. No entanto, a interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada foi significativa ($P < 0,05$) para a atividade enzimática da IAV na raiz. Em pleno sol, a adubação influenciou positivamente a atividade enzimática. Entretanto, nos demais níveis de sombreamento, a adubação não diferiu. O sombreamento apresentou efeito quadrático na atividade enzimática das plantas que não receberam adubação, com valor máximo de $31,57 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 60,35% de sombreamento, enquanto que nas plantas que foram adubadas, o valor mínimo foi de $23,11 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 41,57% de sombreamento (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em raiz de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare

	Adubação ¹	Sombreamentos				Média	CV ²	Equações	R ²	
		0	30	50	80					
INC³										
2 ^a ciclo	0	17,87	23,86	24,58	23,28	22,40 a	26,47	$\hat{Y}_x=22,25$		
	100	24,40	16,32	23,93	23,75	22,10 a				
	Média	21,14	20,09	24,25	23,51	22,25				
IAV³										
2 ^a ciclo	0	7,42 b	24,36 a	31,80 a	28,56 a	23,03	37,48	$\hat{Y}_0= 7,1672+0,8087x-0,0067x^2$	0,99	
	100	38,16 a	20,77 a	27,30 a	34,66 a	30,22				$\hat{Y}_{100}= 37,285-0,6817x+0,0082x^2$
	Média	22,79	22,56	29,55	31,61	26,63				
IAPC³										
2 ^a ciclo	0	12,71	16,00	21,64	10,77	15,28 a	51,32	$\hat{Y}_x=15,26$		
	100	20,56	13,69	13,85	12,89	15,25 a				
	Média	16,63	14,84	17,75	11,83	15,26				

¹kg N.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

Devido ao nitrogênio, que foi fornecido à planta, favorecendo seu crescimento, houve a necessidade de maior mobilização de reservas energéticas da raiz com a degradação e translocação da sacarose para a parte aérea da planta, a fim de suprir a demanda para alongamento de caule e produção de novas folhas, e também para manter o controle osmótico, evitando a desidratação e níveis críticos de estresse hídrico.

A sacarose é a principal forma de carboidrato que é translocada na planta, via floema. Já o amido é um carboidrato insolúvel, de reserva, presente em quase todas as plantas. O interessante é que tanto a sacarose quanto o amido são gerados a partir da triose-fosfato, gerada no ciclo de Calvin. As invertases catalisam a hidrólise altamente exotérmica e irreversível da sacarose em glicose e frutose. Em contraste, uma clivagem reversível da sacarose é catalisada pela sintase da sacarose, em UDPG e frutose, possuindo um papel importante no metabolismo da sacarose em diversas rotas bioquímicas relacionadas a funções metabólicas, estruturais e de armazenamento em células de plantas (Winter & Huber, 2000).

Para o descarregamento apoplástico, as enzimas invertases são fundamentais. É necessário que se mantenha o potencial de sacarose sempre baixo na célula receptora durante o processo de descarregamento, para que não haja refluxo desse açúcar. Em órgãos com descarregamento simplástico, o baixo potencial químico de sacarose é mantido pela respiração, ou pela conversão dos açúcares transportados em compostos necessários para o crescimento, ou em polímeros de estoque. Já em órgãos com descarregamento apoplástico, as invertases desempenham um papel central na manutenção de um baixo potencial de sacarose, para que haja uma chegada contínua desse composto nas células receptoras (Patrick, 1997).

Os teores de açúcar redutor na folha (AR_f) foram influenciados pelo sombreamento associado à adubação nitrogenada com interação significativa ($P < 0,05$) no primeiro ciclo. Em pleno sol e 30% de sombreamento, a adubação promoveu maiores teores de AR_f , entretanto com 50 e 80% de sombreamento, a adubação não diferiu ($P > 0,05$). O sombreamento apresentou efeito linear crescente nos teores de AR_f das plantas não adubadas, aumentando gradativamente os teores, à medida que se aumentava o sombreamento. No entanto, quando as plantas foram adubadas, o efeito linear decresceu, reduzindo os teores com o aumento do sombreamento (Tabela 5).

No segundo ciclo, a interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada não foi significativa ($P > 0,05$) para os teores de AR_f , assim como

ocorreu no sombreamento, apresentando valor médio de 193,28 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Já adubação favoreceu os maiores teores de açúcares redutores nas folhas.

Os teores de açúcar redutor no caule (AR_c) foram influenciados pelo sombreamento associado à adubação nitrogenada com interação significativa ($P < 0,05$) no primeiro ciclo. A adubação promoveu maiores teores de AR_c nas plantas nos níveis de 0, 30 e 50% sombreamento. Entretanto, a 80%, os teores não diferiram quanto a adubação. O sombreamento apresentou efeito quadrático nos teores de AR_c das plantas não adubadas, com valores máximos de 243,50 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 48,34% de sombreamento. Em contrapartida, nas plantas adubadas, o efeito foi linear decrescente, reduzindo os teores à medida que se aumenta o sombreamento. No segundo ciclo, a interação entre os diferentes níveis de sombreamento e a adubação nitrogenada não foi significativa ($P > 0,05$) para os teores de AR_c , assim como ocorreu no sombreamento, apresentando valor médio de 264,16 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Já adubação favoreceu os maiores teores de açúcares redutores nos caules.

Tabela 5. Teores de açúcar redutor na folha (AR_f), açúcar redutor no caule (AR_c) e açúcar redutor na raiz (AR_r) de Caim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois períodos distintos

	Adubação ¹	Sombreamentos				Média	CV ²	Equações	R ²
		0	30	50	80				
Açúcar redutor na folha³									
1º ciclo	0	154,29 b	197,45 b	207,27 a	240,98 a	200,00	21,36	$\hat{Y}_0 = 158,05 + 1,0488x$	0,98
	100	263,17 a	264,77 a	235,80 a	183,65 a	236,85		$\hat{Y}_{100} = 277,68 - 1,0207x$	
	Média	208,73	231,11	221,53	212,32	218,42			
2º ciclo	0	166,54	165,72	190,27	152,29	168,70 b	15,43	$\hat{Y}_x = 193,28$	
	100	228,78	250,31	203,60	188,74	217,86 a			
	Média	197,66	208,01	196,94	170,51	193,28			
Açúcar redutor no caule³									
1º ciclo	0	87,13 b	282,27 b	184,19 b	197,52 a	187,78	31,60	$\hat{Y}_0 = 101,92 + 5,8583x - 0,0606x^2$	0,62
	100	417,72 a	420,82 a	312,75 a	214,04 a	341,33		$\hat{Y}_{100} = 449,9 - 2,7142x$	
	Média	252,43	351,54	248,47	205,78	264,55			
2º ciclo	0	251,82	230,67	232,20	236,53	237,80 b	22,32	$\hat{Y}_x = 264,16$	
	100	320,27	303,82	261,51	276,45	290,51 a			
	Média	286,05	267,25	246,86	256,49	264,16			
Açúcar redutor na raiz³									
2º ciclo	0	163,58 a	210,95 a	196,73 a	164,78 a	184,01	16,82	$\hat{Y}_0 = 165,29 + 2,0877x - 0,0264x^2$	0,94
	100	179,72 a	155,47 b	153,93 b	178,17 a	166,82		$\hat{Y}_{100} = 166,82$	
	Média	171,65	183,21	175,33	171,48	175,42			

¹kg N.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

Os teores de açúcar redutor na raiz (AR_r) foram influenciados pelo sombreamento associado à adubação nitrogenada com interação significativa ($P < 0,05$). A ausência de adubação favoreceu os maiores teores AR_r nos níveis 30 e 50% de sombreamento. O sombreamento apresentou efeito quadrático nos teores de AR_r das plantas não adubadas, com valores máximos de $208,18 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 41,09% de sombreamento. Enquanto que os teores não diferiram nas plantas que foram adubadas, apresentando valor médio de $166,82 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A redução dos teores de açúcares redutores nas folhas, principalmente no segundo ciclo, pode estar relacionada as baixas taxas fotossintéticas. Uma vez que o sombreamento reduz a luminosidade incidente e a velocidade de crescimento, tendo como consequência uma menor área foliar, possivelmente a taxa fotossintética será comprometida, resultando na produção dos fotoassimilados.

A atividade da α -amilase no caule foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação nitrogenada com interação significativa ($P < 0,05$) apenas no segundo ciclo. No primeiro ciclo, a atividade enzimática não diferiu quanto a adubação. No entanto, o sombreamento apresentou efeito linear decrescente, reduzindo gradativamente a atividade enzimática, à medida que se aumenta o sombreamento (Tabela 6).

No segundo ciclo e em pleno sol, a maior atividade enzimática foi obtida quando as plantas foram adubadas. Os demais níveis de sombreamento não diferiram quanto a adubação. O sombreamento apresentou efeito quadrático sob a atividade enzimática das plantas não adubadas, com valor máximo de $94,04 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 42,17% de sombreamento. No entanto, quando adubadas, o efeito foi linear decrescente.

Na raiz, a atividade da α -amilase foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação nitrogenada com interação significativa ($P < 0,05$). Em pleno sol, a ausência de adubação promoveu maior atividade dessa enzima, enquanto a 30 e 50%, as maiores atividades foram observadas na presença de adubação. O sombreamento apresentou efeito quadrático na atividade enzimáticas, tanto nas plantas não adubadas quanto nas adubadas. Na ausência de adubação, o valor mínimo foi de $0,25 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 41,05% de sombreamento e na presença de adubação, o valor máximo foi de $0,76 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 35,75% de sombreamento.

Tabela 6. Atividade da α e β -amilase em caule e raiz de Capim Marandú, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 100 kg de nitrogênio por hectare, em dois ciclos

Adubação ¹	Sombreamentos				Média	CV ²	Equações	R ²			
	0	30	50	80							
α-amilase – Caule³											
1º ciclo	0	155,86	83,98	56,93	58,21	88,75 a	70,91				
	100	120,64	257,09	89,99	72,93	135,16 a					
	Média	138,25	170,54	73,46	65,57	111,96			$\hat{Y}_x=157,58-1,1406x$	0,57	
2º ciclo	0	20,13 b	129,64 a	52,72 a	52,65 a	63,78	49,88	$\hat{Y}_0= 30,137+3,0782x-0,0365x^2$	0,48		
	100	178,90 a	98,25 a	57,61 a	54,27 a	97,26				$\hat{Y}_{100}= 160,69-1,5858x$	0,85
	Média	99,51	113,94	55,16	53,46	80,52					
α-amilase – Raiz³											
2º ciclo	0	0,94 a	0,22 b	0,18 b	0,52 a	0,47	48,92	$\hat{Y}_0= 0,934-0,0332x+0,004x^2$	0,99		
	100	0,47 b	0,89 a	0,59 a	0,41 a	0,59				$\hat{Y}_{100}= 0,5048+0,0143x-0,0002x^2$	0,72
	Média	0,71	0,56	0,39	0,47	0,53					
β-amilase – Caule³											
1º ciclo	0	101,14	65,92	90,14	123,71	95,23 b	70,07				
	100	333,31	293,99	238,74	128,82	248,72 a					
	Média	217,23	179,96	164,44	126,27	171,97			$\hat{Y}_x=171,97$		
2º ciclo	0	322,15 a	52,52 a	84,37 a	90,09 b	137,28	60,14	$\hat{Y}_0= 311,58-9,9789x+0,0918x^2$	0,91		
	100	140,83 b	122,79 a	134,82 a	294,12 a	173,14				$\hat{Y}_{100}= 143,93-2,8903x+0,0591x^2$	0,98
	Média	231,49	87,66	109,60	192,10	155,21					
β-amilase – Raiz³											
2º ciclo	0	1,17	0,41	0,67	0,87	0,78 a	60,30				
	100	0,66	0,36	0,44	1,13	0,65 a					
	Média	0,91	0,39	0,55	1,00	0,71			$\hat{Y}_x= 0,8939-0,0244x+0,0003x^2$	0,99	

¹kg N.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si ($p<0,05$).

A atividade da β -amilase no caule foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação nitrogenada com interação significativa ($P < 0,05$) apenas no segundo ciclo. No primeiro ciclo, a adubação nitrogenada favoreceu a maior atividade da β -amilase no caule, no entanto, o sombreamento não diferiu, apresentando valor médio de $171,97 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No segundo ciclo, a 80% de sombreamento, a adubação favoreceu a atividade da beta amilase. Porém, nos demais níveis de sombreamento, a adubação não diferiu. O sombreamento apresentou efeito quadrático sob as plantas não adubadas e adubadas. Na ausência de adubação, o valor mínimo observado foi de $40,39 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 54,34% de sombreamento, e na presença de adubação, o valor mínimo foi de $208,59 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 24,45% de sombreamento. Na raiz, não apresentou interação entre o sombreamento associado à adubação nitrogenada e a adubação não diferiu quanto aos níveis de sombreamento ($P > 0,05$). No entanto, o sombreamento apresentou efeito quadrático, com atividade mínima de $0,39 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 40,67% de sombreamento.

Acredita-se que somente com a ação conjunta da α -amilase, β -amilase, enzima desramificadora e α -glicosidase pode-se obter *in vivo* a completa hidrólise do amido (Beck; Ziegler, 1989; Sarikaya et al., 2000). No entanto, a única enzima, em plantas, capaz de fazer a liberação de glicanos solúveis, a partir de grânulos de amido, seja a α -amilase (Henrissat e Bairoch, 1996).

A quantidade de α e β -amilase depende de vários fatores: variedade, condições climáticas, competição por nutrientes. Quanto mais elevada a temperatura, maior a atividade de degradação dessa enzima (Saika et al., 2005). Dessa forma, a degradação do amido é necessária quando a planta se encontra em algum tipo de estresse. Neste caso, o sombreamento e o corte (pastejo) caracterizam um fator estressante, que prejudica a fotossíntese. Para que a planta tenha uma imediata recuperação, ela utiliza da degradação de suas reservas, aumentando a atividade dessas enzimas.

Desse modo, a área foliar remanescente após desfolhação assume grande importância por aumentar o vigor da rebrotação, resultado da imediata produção de carboidratos pela fotossíntese, fato que proporciona à planta menor tempo de dependência dos carboidratos de reserva como fonte de energia para a sua recuperação.

CONCLUSÕES

A adubação aumenta a atividade enzimática. As invertases aumentam atividade quando sombreadas de 30 a 50% e em pleno sol, está diretamente ligada ao sistema osmorregulador. A redução dos teores dos açúcares redutores está relacionada a baixa taxa fotossintética e o aumento α e β -amilase está associada a utilização das fontes de reservas para suprir as necessidades enérgicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, A.G. Sugarcane physiology. Amsterdam: **Elsevier**, v. 1, p.752-759. 1973.
- ALVAREZ, V. H.; RIBEIRO, A. C. Calagem. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais (CFSMG). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª aproximação, Viçosa, p. 41-60, 1999.
- BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. V.40, p.95-117, 1989.
- CAZETTA, J.O.; SEEBAUER, J.R.; BELOW, F.E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. **Annals of Botany**, London, v. 84, n. 6, p. 747-754, 1999.
- FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany, Exeter**, v. 96, n. 2, p. 169– 175, 2005.
- FRIES, D. D. **Comportamento de α amilase/invertases e mudanças anatômicas associadas ao cálcio exógeno no período de germinação e/ou alagamento de plântulas do milho** (*Zea mays* L.) “Saracura” – BRS-4154. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, p. 49, 2003.
- GAYLER, K.R.; GLASZIOU, K.T. Physiological functions of acid and neutral invertases in growth and sugar storage in sugar cane. **Plant Physiology**, v.27, p.25-31, 1972.
- GIBEAUT, D.M. et al. Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheath pulvinus of oat (*Avena sativa*). **Plant Physiology**, v.4 n.94, p.411-416, 1990.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Journal Biochemistry**. V.316, n.2, p.695-696, 1996.
- LINGLE, S.E. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. **Crop Science**, v.39, p.480-486, 1999.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- PATRICK J.W. Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. p. 165–190. 1997.
- ROHWER, J.M.; BOTHA, F.C. Analysis of sucrose accumulation in the sugarcane culm on the basis of in vitro kinetic data. **Biochemistry Journal**, v.358, p.437-445, 2001.
- SAIKA, H.; NAKAZONO, M.; IKEDA, A.; YAMAGUCHI, J.; MASAKI, S.; KANEKATSU, M., NEMOTO, K. A transposon-induced spontaneous mutation results in low α - and β -amylase content in rice. **Plant science**, v.169, p.239-244, 2005.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M., MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. **Process Chemistry**. V.35, n.7, p.711-715, 2000.

SHONIESKI, F.R.; VIÉGAS, J.; BERMUDES, R.F. *et al.* Composição botânica e estrutural e valor nutritivo de pastagens de azevém consorciadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.6, p.550-556, 2011.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS/STAT User's Guide**. Version 9.2. Cary,NC: SAS Institute, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 437 p., 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.A.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. (6. Ed) Porto Alegre: SC. 2017.

TYMOWSKA-LALANE, Z.; KREIS, M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. **Advance Botanical Reserch**, v.28, p.71-117, 1998.

WINTER H., HUBER S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Science**,p. 31- 67. 2000.

ZENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W. T.; KOCH, K. E. Rapid repression of maize invertases by low oxugem. Invertases/sucrose synthase balance, sugar signding potencial, and seedlling survival. **Plant Physiology**, v.121, n. 2, p. 599-608, 1999.

IV – CAPÍTULO II

ATIVIDADE DE INVERTASES E AMILASES EM ESTILOSANTES CAMPO GRANDE SOB SOBREAMENTO E ADUBAÇÃO FOSFATADA

RESUMO - Objetivou-se avaliar a atividade de invertases e amilases em Estilosantes Campo Grande sob diferentes níveis de sombreamento e adubação fosfatada. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em um esquema fatorial 4x2 (níveis de sombreamento 0%, 30%, 50% e 80% e adubação fosfatada 0 e 150 kg N.ha⁻¹). Foi avaliado a atividade das enzimas, invertase neutra do citossol (INC), ácida do vacúolo (IAV) e ácida da parede celular (IAPC), os teores de açúcares redutores e atividade das enzimas α e β -amilases, nas folhas, caules e raízes. Adotou-se $\alpha = 0,05$. A atividade da INC na folha, no primeiro e segundo ciclo, apresentou interação significativa. No 1º ciclo, as plantas que receberam adubação e com 0 e 30% de sombreamento apresentaram maiores atividades enzimáticas. Já à 50% de sombreamento, a maior atividade foi observada nas plantas não adubadas. Já no 2º ciclo, as maiores atividades enzimáticas foram observadas nas adubadas e com 0, 50 e 80% de sombreamento. Assim como na IAV, apenas no primeiro ciclo, onde as plantas que adubadas e à 0% de sombreamento apresentaram maiores atividades enzimáticas. No entanto, IAPC apresentou interação significativa somente no 1º ciclo. As plantas que receberam adubação e 30% de sombreamento apresentaram maiores atividades. Os teores de açúcares redutores na folha (AR_f) apresentaram interação significativa no primeiro ciclo, onde 0% de sombreamento, os maiores teores de AR_f foram observados na presença de adubação, enquanto a 80% de sombreamento, na ausência de adubação. A interação não foi significativa para a atividade da α -amilase no caule, no 1º ciclo, assim como a adubação e o sombreamento não diferiram quanto a atividade da α -amilase no caule, apresentando atividade média de 76,45 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No entanto, no 2º ciclo, a interação foi significativa. A atividade da β -amilase no caule no 1º ciclo e na raiz apresentou interação significativa. A maior atividade β -amilase no caule foi observado a 30 e 50% de sombreamento nas plantas não adubadas. Conclui-se que a adubação favorece a atividade das invertases, uma vez que o fósforo participa da constituição de diversas moléculas mediadoras da fotossíntese, no entanto o sombreamento não altera diretamente na atividade enzimática. Os teores de açúcares redutores sugerem alta atividade fotossintética em sombreamento de até 30%. A

α e β -amilases pouco se alteraram com o sombreamento e adubação, mostrando que ausência de adubação resulta em maior utilização das reservas.

Palavras-chave: Fósforo, Fotoassimilados, Metabolismo

INVERTASE ACTIVITY AND AMILASES IN GROWING FIELD STYLOSANTS UNDER FOSPHATING FOCUSING AND FODDER

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the activity of invertases and amylases in *Estilosantes* Campo Grande under different levels of shading and phosphate fertilization. The experiment was carried out in greenhouse, in a 4x2 factorial scheme (0%, 30%, 50% and 80% shading levels and phosphate fertilization 0 and 150 kg N.ha⁻¹). The activity of the enzymes, cytosol-neutral invertase (Inv-N), vacuole acid (Inv-V) and cell-acid-acidity (Inv-CW) were determined, the levels of reducing sugars and the activity of α and β -amylases in leaves, stems and roots. A = 0.05 was used. The Inv-N activity in the leaf, in the first and second cycle, presented significant interaction. In the 1st cycle, the plants that received fertilization and with 0 and 30% of shading presented greater enzymatic activities. At 50% shading, the highest activity was observed in the non-fertilized plants. In the second cycle, the highest enzymatic activities were observed in the fertilizers and with 0, 50 and 80% shading. As in the InvV only in the first cycle, where the plants that fertilized and at 0% of shading presented higher enzymatic activities. However, Inv-CW showed significant interaction only in the first cycle. The plants that received fertilization and 30% of shading presented greater activities. Reducing sugars contents in the leaf (AR_f) showed significant interaction in the first cycle, where 0% of shading, the highest contents of AR_f were observed in the presence of fertilization, while 80% of shading, in the absence of fertilization. The interaction was not significant for α -amylase activity in the stem, in the first cycle, as well as fertilization and shading did not differ in the activity of α -amylase in the stem, presenting a mean activity of 76.45 $\mu\text{mol gli. MF-1.h-1}$. However in the 2nd cycle, the significant interaction. The activity of β -amylase in the stem in the 1st cycle and in the root showed significant interaction. The higher β -amylase activity in the stem was observed at 30 and 50% shading in the non-fertilized plants. In general, shading does not directly alter enzymatic activity. It is concluded that the fertilization favors the activity of the invertases, since the phosphorus participates in the constitution of several molecules mediating photosynthesis, however, the shading does not change directly in the enzymatic activity. The RS contents suggest high photosynthetic activity in shading up to 30%. The α and β -amylases were little affected by shading and fertilization, showing that the

absence of fertilization results in higher reserves utilization. Keywords: Phosphorus, Photoassimilates, Metabolism

INTRODUÇÃO

A sustentabilidade dos sistemas pastoris pode ser melhorada com a utilização de leguminosas em consórcio com gramíneas (Shonieski et al., 2011), reduzindo os gastos diretos com fertilizantes, melhorando a disponibilidade de forragem pelo aporte de nitrogênio ao sistema por meio de sua reciclagem e transferência para a gramínea consorciada e aumentar também o período de utilização das pastagens (Barcellos et al., 2008), desde que os recursos bióticos e abióticos não sejam um fator limitante para o desenvolvimento de uma das espécies.

De acordo com a Embrapa Gado de Corte (2000), o Estilosantes é uma forrageira rica em proteína e executa uma função importante de transformar o nitrogênio encontrado na atmosfera e fixá-lo biologicamente no solo, reduzindo os investimentos em insumos agrícolas, contribuindo para a redução dos impactos ambientais e possibilitando maior ganho de peso nos animais.

As plantas dependem da aquisição de energia luminosa para o crescimento e persistência. Os carboidratos são sintetizados nas folhas através da fotossíntese e translocados para tecidos na forma de sacarose, a fim de sustentar o metabolismo e crescimento, ou para serem armazenados como sacarose ou amido (Franklin & Whitelam, 2005). No entanto, com a limitação de luminosidade, as plantas buscam estratégias adaptativas para tolerar ou escapar do sombreamento causado pela vegetação vizinha. Por conta disso, as plantas estão continuamente ajustando seu crescimento e desenvolvimento para otimizar a atividade fotossintética frente a competição por luz.

Nos últimos anos, tornou-se evidente que os açúcares, principalmente a sacarose e os seus produtos de clivagem, são importantes sinais metabólicos que afetam a expressão de diferentes classes de genes e estão envolvidos na regulação do desenvolvimento das plantas. Assim, o metabolismo, fracionamento e detecção da sacarose são vitais para todas as fases do ciclo de vida da planta (Roitsch & González, 2004).

A sacarose dissacarídica e os produtos de clivagem, glicose e frutose são as moléculas centrais para a translocação, metabolismo e detecção de carboidratos em plantas superiores. As invertases medeiam a clivagem hidrolítica da sacarose nos monômeros de hexose. As plantas possuem três tipos de invertases, que estão localizadas no apoplasto, no citoplasma e no vacúolo, respectivamente. Tornou-se evidente que as isoenzimas de invertase extracelular e vacuolar são enzimas metabólicas chave que estão envolvidas em vários aspectos do ciclo de vida da planta e na resposta da planta a

estímulos ambientais porque seus substratos e produtos de reação são nutrientes e moléculas de sinal (Clark et al., 2003). No entanto, pouco se sabe sobre a atividade dessas enzimas em plantas leguminosas forrageiras submetidas ao sombreamento e adubação fosfatada.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a atividade enzimática de invertases e amilases de Estilosantes Campo Grande sob diferentes níveis de sombreamento e na presença ou ausência de adubação fosfatada.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e condução do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação no período de 01 de julho a 09 de novembro de 2016, localizada na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus “Juvino Oliveira”, na cidade de Itapetinga, BA, situada nas seguintes coordenadas: 15°38’46” de latitude sul, 40°15’24” de longitude oeste e altitude média de 280 m. O clima do município, de acordo com a classificação köppen, é do tipo “Cw”, mesotérmico úmido e sub-úmido quente.

O ensaio foi conduzido em um esquema fatorial 4 x 2, com quatro repetições, sendo 4 níveis de sombreamento (0%, 30%, 50% e 80% de sombreamento) e com e sem adubação fosfatada de 150 kg P₂O₅.ha⁻¹, em um delineamento em blocos ao acaso, totalizando 32 vasos plásticos com capacidade para 10 dm³ e um período experimental de 84 dias.

O solo utilizado foi coletado na Fazenda Bela Vista, localizada no município de Encruzilhada, BA, sendo classificado como latossolo vermelho escuro, com textura franco argilo arenosa. Para análise química de solo, amostras simples foram coletadas em pontos aleatórios com a profundidade de 0-20 cm, secas ao ar, homogeneizadas para se obter a amostra composta, em seguida, enviada ao Departamento de Engenharia Agrícola e Solos da UESB para a realização de análises físicas e químicas, descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Análise química do solo

pH	*mg/dm ³	*cmol/dm ³ de solo.....										%	g/dm ³
(H ₂ O)	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺	Na ⁺	S.B ¹	t ²	T ³	V ⁴	m ⁵	M.O. ⁶
5,1	2	0,30	1,7	1,3	0,4	4,3	-	3,3	3,7	8,0	41	11	25

¹Soma de bases. ²CTC efetiva. ³CTC pH 7. ⁴Saturação por bases. ⁵Saturação por Al³⁺. ⁶Matéria orgânica. Fonte: Laboratório de solos da UESB.

Conforme os resultados da análise de solo e seguindo as recomendações da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (Alvarez & Ribeiro, 1999), onde foi adotado o nível médio tecnológico, houve a necessidade de realizar a calagem, considerando a baixa relação cálcio/magnésio e para elevar a saturação de bases para 50, foi aplicado calcário calcítico 30 dias antes, na quantidade de 4,8 g por vaso e a adubação fosfatada, realizada no momento do plantio, com 150 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, que equivale a 2,16 g de superfosfato triplo por vaso.

Para determinação da capacidade de campo, os vasos com solo seco foram pesados, sendo encharcados e pesados novamente após o escoamento total da água. Pela

diferença de peso seco e molhado, foi determinada a máxima capacidade de retenção de água, a qual foi em torno de 18%.

O plantio foi realizado diretamente nos vasos em 01 de julho de 2016, usando sementes de *Estilosantes* Campo Grande vendidas comercialmente e em 15 de julho. Foram selecionadas um número de dez plântulas para cada vaso. Após 15 dias, foi feito o desbaste restando quatro plântulas por vaso experimental.

No dia 16 de agosto, foi realizado o corte de uniformização na altura de 15 cm do solo e implantação das telas para o sombreamento artificial. O sentido de posição das telas de náilon foi Leste-Oeste. Os percentuais de sombreamento utilizados foram de 0, 30, 50 e 80%, de acordo com o fabricante.

As plantas foram irrigadas diariamente mantendo a capacidade de campo durante o período experimental. As temperaturas mínimas, máximas e médias foram aferidas durante o período experimental, que compreende da data de 16 de agosto a 09 de novembro de 2016, totalizando 84 dias (Figura 1).

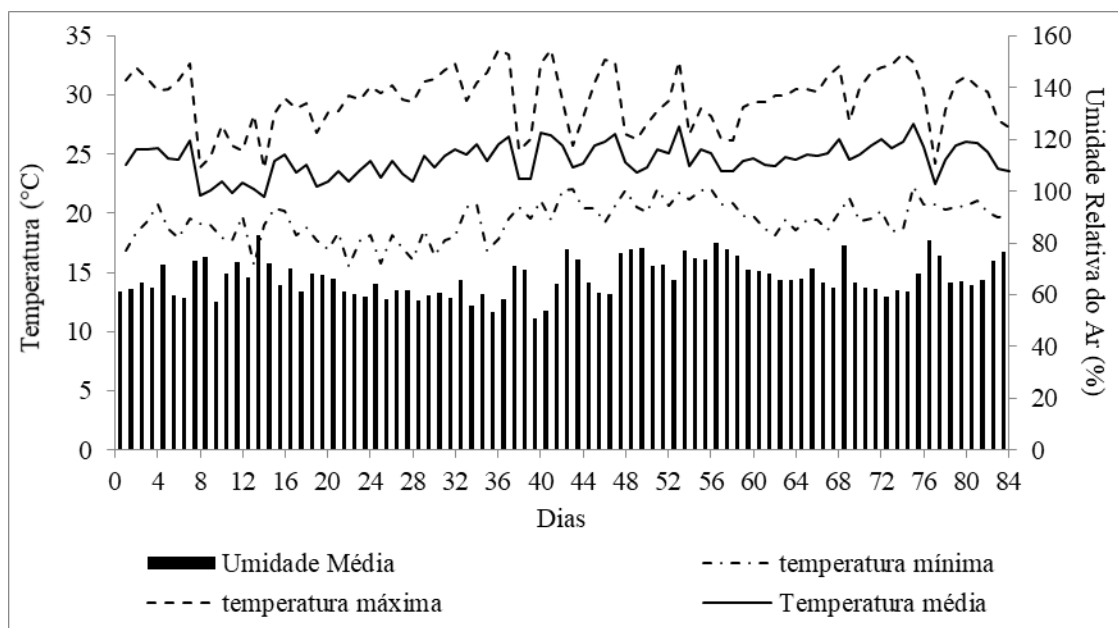


Figura 1: Temperaturas máxima, média e mínima e Umidade Relativa do Ar durante o período experimental.

As coletas para as análises enzimáticas foram realizadas em dois ciclos, 13 de setembro e 09 de novembro, que correspondem a 28 após o corte de uniformização e 28 dias após o segundo corte, a 15 cm de altura. Foram coletadas a terceira ou quarta folha completamente expandida, o caule e a raiz plantas ao final do segundo período quando os vasos foram desmanchados. No momento das coletas, o material vegetal foi alocado em sacos de papel alumínio, previamente identificados e posteriormente imersos em

nitrogênio líquido para cessar a atividade enzimática. Todo material foi armazenado em freezer a -80°C para em seguida serem feitas as análises da atividade enzimática.

Avaliações de Atividade Enzimática

Extração e Incubação das Invertases

A extração e incubação das invertases solúveis, invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase neutra do citossol (INC) foram realizadas conforme descrito por Zeng et al (1999), e as invertases insolúveis, invertase ácida da parede celular (IAPC), segundo Cazetta et al. (1999), ambas modificadas por Fries et al. (2003).

A IAV e INC foram extraídas pela homogeneização de 250 mg de massa fresca de folha, caule e raiz, maceradas em cadinho de porcelana sobre o gelo, com 1,8 mL do tampão de extração contendo 100mM de fosfato de potássio (pH 7,5), 5 mM MgCl_2 , 20 mM de ácido ascórbico, seguido pela centrifugação a 9.000 g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C . O sobrenadante foi coletado para incubação da IAV e INC.

Para a extração da IAPC, o pellet foi lavado e homogeneizado com 1 mL do seguinte tampão: 200 mM citrato de sódio (pH 4,8), 5 mM MgCl_2 , 20 mM de ácido ascórbico, 1 M NaCl. Em seguida, realizou-se uma nova centrifugação a 9.000 g por 20 minutos e temperatura de 4°C . O sobrenadante foi coletado para incubação da IAPC.

A atividade das enzimas foi realizada em tampão contendo 100mM de fosfato de potássio (pH 7,5), 0,5 mM MgCl_2 , para INC e tampão contendo 200mM de citrato de sódio (pH 4,8), 0,5 mM MgCl_2 , para IAV e IAPC ambos acrescidos de 200 mM de sacarose, sendo utilizado um volume de 600 μL por incubação.

A incubação foi realizada nos tempos zero (T0) e sessenta minutos (T60). Para o T0, 200 μL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e a reação, imediatamente, foi paralisada em gelo. Reações há 0 minutos foram determinadas para eliminar os açúcares redutores pré-existentes. Para o T60, 200 μL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e incubação em banho-maria, a 30°C , por 60 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada em gelo.

Quantificação das invertases

As enzimas foram quantificadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se curva padrão de glicose e pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). A atividade das enzimas foi obtida pela diferença dos valores após 60 minutos de incubação daqueles T0. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram obtidos a partir do extrato das invertases solúveis, no tempo 0. A quantificação foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se curva padrão de glicose e pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959).

Extração e Incubação de α e β -amilase

A extração e incubação das amilases, α e β , foram realizadas como descritas por Skadsen (1993), modificado por Fries et al., (2003).

A α e β -amilases foram extraídas pela homogeneização de 250 mg de massa fresca do caule e raiz, maceradas em cadinho de porcelana sobre o gelo, com 2 mL do tampão de extração contendo 200 mM de fosfato de potássio (pH 5,5), 20 mM ácido ascórbico, seguido pela centrifugação a 9.000 g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado em tubos separados, sendo metade para α -amilase e metade para β -amilase. Os tubos identificados para avaliação da α -amilase foram colocados em banho-maria a 70°C por 20 minutos, a fim de inibir a ação da β -amilase. Posteriormente, todos os tubos foram mantidos em gelo até a incubação.

A atividade das enzimas foi realizada em tampão contendo acetato de potássio 200 mM (pH 5,5), 5 mM de CaCl_2 e 1% de amido solúvel, para α amilase e tampão contendo acetato de potássio 200 mM (pH 5,5) e 1% de amido solúvel, para β -amilase, sendo utilizado um volume final de 400 μL para ambas.

A incubação foi realizada nos tempos zero (T0) e sessenta minutos (T60). Para o T0, 100 μL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e a reação, imediatamente, foi paralisada em gelo. Para o T60, 100 μL da amostra foram homogeneizadas em microtubos tipo eppendorf e incubação em banho-maria, a 30°C, por 60 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada em gelo.

Quantificação de α e β -amilase

As enzimas foram quantificadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se curva padrão de glicose e pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). A atividade das enzimas foi obtida pela diferença dos valores após 60 minutos de incubação daqueles T0. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância considerando como fontes de variação o efeito da adubação fosfatada (0 e 150 $\text{kg}.\text{ha}^{-1}$), o efeito do sombreamento

(0, 30, 50 e 80% de sombreamento) e a interação adubação fosfatada e sombreamento. A interação foi desdobrada, ou não, de acordo com a significância. O efeito do fósforo foi estudado por meio do teste F e o efeito do sombreamento por meio da análise de regressão onde os coeficientes foram testados pelo t. Adotou-se $\alpha = 0,05$ (SAS, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da INC na folha, no primeiro e segundo ciclos, foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$). No primeiro ciclo, as plantas que receberam adubação e foram submetidas à pleno sol (0% de sombreamento) e 30% de sombreamento apresentaram maiores atividades enzimáticas. Já as submetidas à 50% de sombreamento, a maior atividade foi observada nas plantas não adubadas. No entanto, quando a 80% de sombreamento, a atividade enzimática não diferiu ($P > 0,05$) quanto a adubação. O sombreamento apresentou efeito quadrático, apresentando máxima atividade da INC na folha das plantas que receberam adubação fosfatada, com valor de $47,74 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 47,21% de sombreamento. No entanto, quando as plantas não foram adubadas, o efeito do sombreamento foi linear decrescente, reduzindo gradativamente a atividade enzimática, à medida que se aumenta o sombreamento (Tabela 2).

No segundo ciclo, as plantas que receberam adubação e foram submetidas à pleno sol (0% de sombreamento) e 50 e 80% de sombreamento, apresentaram maiores atividades enzimáticas. No entanto, quando a 30% de sombreamento, a atividade enzimática não diferiu ($P > 0,05$) quanto a adubação. O sombreamento apresentou efeito quadrático, apresentando mínima atividade da INC na folha das plantas que recebeu adubação fosfatada, com valor de $43,36 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 39,06% de sombreamento. Em contrapartida, quando as plantas não foram adubadas, não houve diferenciação quanto ao sombreamento, apresentando valor médio de $95,18 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A atividade da IAV na folha foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$) apenas no primeiro ciclo. As plantas que receberam adubação e foram submetidas à pleno sol (0% de sombreamento) apresentaram maiores atividades enzimáticas. Já as submetidas à 80% de sombreamento, a maior atividade foi observada nas plantas não adubadas. O sombreamento apresentou efeito linear crescente sob a atividade da IAV na folha das plantas não adubadas, aumentando a atividade da enzima com o aumento gradativo do sombreamento. No entanto, quando adubadas, não diferiu, apresentando valor médio de $51,22 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. No segundo ciclo, as plantas na ausência de adubação fosfatada, apresentaram maior atividade da IAV na folha. O sombreamento não diferiu quanto a atividade enzimática, apresentando valor médio de $101,25 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Tabela 2. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folha de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos

	Adubação ¹	Sombreamentos (%)				Média	CV ²	Equações	R ²
		0	30	50	80				
INC ³									
1ª ciclo	0	33,89 b	43,28 b	50,23 a	40,11 a	41,88	20,22	$\hat{Y}_0 = 33,255 + 0,6138x - 0,0065x^2$ $\hat{Y}_{150} = 60,78 - 0,2879x$	0,90
	150	57,17 a	63,11 a	37,73 b	39,04 a	49,26			
	Média	45,53	53,19	43,98	39,58	45,57			
2ª ciclo	0	65,96 b	45,04 a	44,57 b	68,24 b	55,95	27,06	$\hat{Y}_0 = 66,088 - 1,1639x + 0,0149x^2$ $\hat{Y}_{150} = 95,18$	0,99
	150	109,67 a	55,50 a	114,42 a	101,13 a	95,18			
	Média	87,81	50,27	79,49	84,69	75,57			
IAV ³									
1ª ciclo	0	16,63 b	43,78 a	54,56 a	85,66 a	50,16	26,27	$\hat{Y}_0 = 16,401 + 0,8439x$ $\hat{Y}_{150} = 51,22$	0,99
	150	56,89 a	53,96 a	47,80 a	46,24 b	51,22			
	Média	36,76	48,87	51,18	65,95	50,69			
2ª ciclo	0	120,69	155,25	95,05	123,71	123,67 a	53,10	$\hat{Y}_x = 101,25$	
	150	131,53	50,38	57,43	75,96	78,82 b			
	Média	126,11	102,82	76,24	99,83	101,25			
IAPC ³									
1ª ciclo	0	8,91 a	5,13 b	9,24 a	30,21 a	13,37	42,86	$\hat{Y}_0 = 9,0569 - 0,3975x + 0,0083x^2$ $\hat{Y}_{150} = 13,13$	0,99
	150	8,36 a	14,59 a	15,80 a	12,79 b	12,89			
	Média	8,64	9,86	12,52	21,50	13,13			
2ª ciclo	0	3,54	3,57	3,51	0,64	2,82 a	53,86	$\hat{Y}_x = 4,1215 - 0,032x$	
	150	4,31	2,93	2,27	1,96	2,87 a			
	Média	3,93	3,25	2,89	1,30	2,84			

¹kg P₂O₅.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

A atividade da IAPC na folha foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$) somente no primeiro ciclo. As plantas que receberam adubação e foram submetidas 30% de sombreamento apresentaram maiores atividades enzimáticas. Já as submetidas à 80% de sombreamento, a maior atividade foi observada nas plantas não adubadas. O sombreamento apresentou efeito quadrático, apresentando mínima atividade da IAPC na folha das plantas que receberam adubação fosfatada, com valor de $4,29 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 23,95% de sombreamento. No entanto, quando as plantas não foram adubadas, o sombreamento não diferiu, apresentando valor médio de $13,13 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No segundo ciclo, a adubação não diferiu quanto a atividade da enzima, porém o sombreamento apresentou efeito linear crescente, aumentando a atividade enzimática com o aumento do sombreamento.

A produção de carboidratos, através da fotossíntese, é a característica mais proeminente das plantas e a sacarose, dissacarídeo não redutor, desempenha um papel central no metabolismo das plantas. Os carboidratos são sintetizados em folhas de origem e translocados para tecidos na maioria das espécies na forma de sacarose para sustentar o metabolismo e crescimento heterotróficos, ou para serem armazenados como sacarose ou amido (Roitsch; González, 2004).

As enzimas invertases quebram a sacarose em hexoses, disponibilizando às células carbono e energia para os processos de respiração e bem como energia para a síntese de numerosos compostos diferenciados. As invertases podem ainda estar envolvidas no transporte de sacarose a longas distância, por criar o gradiente de concentração de sacarose entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema (Eschrich, 1980; Mohan et al., 2005).

Dessa forma, as plantas em pleno sol e que receberam a adubação fosfatada, apresentaram uma maior atividade das enzimas invertases devido à alta atividade fotossintética. Isto porque o fósforo (P) é elemento fundamental na constituição de moléculas catalisadoras da fotossíntese, coenzimas, na transferência de energia da célula, na respiração, componente estrutural dos ácidos nucleicos de genes e cromossomos formação de compostos orgânicos como fosfoproteínas, fosfolipídeos e fotoassimilados.

As limitações na disponibilidade de P, no início do ciclo vegetativo, podem resultar em restrições no desenvolvimento, das quais a planta não se recupera posteriormente, mesmo aumentando o suprimento de P a níveis adequados (Grant et al., 2001).

A atividade da INC no caule foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$) apenas no primeiro ciclo. As plantas que receberam adubação e foram submetidas 30 e 80% de sombreamento apresentaram maiores atividades enzimáticas. Já as submetidas à 0 e 50% de sombreamento, a atividade não diferiu ($P > 0,05$). O sombreamento apresentou efeito quadrático, apresentando máxima atividade da INC no caule das plantas que receberam adubação fosfatada, com valor de $45,34 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 50,97% de sombreamento. E quando as plantas não foram adubadas, a atividade máxima foi de $97,59 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 41,27% de sombreamento. No segundo ciclo, a adubação e o sombreamento não diferiram quanto a atividade enzimática ($P > 0,05$) apresentando valor médio de $116,72 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tabela 3).

A atividade da IAV no caule foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$) apenas no segundo ciclo. As plantas não adubadas e em pleno sol apresentaram maiores atividades enzimáticas. As demais não diferiram quanto a adubação ($P > 0,05$). O sombreamento apresentou efeito quadrático, apresentando mínima atividade da IAV no caule das plantas que não receberam adubação fosfatada, com valor de $42,60 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 57,62% de sombreamento. Nas plantas adubadas, a atividade da enzima não diferiu, apresentando valor médio de $74,11 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. No primeiro ciclo, a adubação proporcionou maior atividade enzimática da IAV no caule. No entanto, o sombreamento não diferiu, apresentando valor médio de $63,78 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A interação não foi significativa ($P > 0,05$) para a atividade da IAPC nos dois ciclos. No primeiro ciclo, houve maior atividade da enzima quando as plantas receberam adubação e o sombreamento não diferiu, apresentando valor médio de $16,34 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. No entanto, no segundo ciclo, a adubação e o sombreamento não diferiram, apresentando valor médio de $2,36 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Tabela 3. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em caule de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos

	Adubação ¹	Sombreamentos (%)				Média	CV ²	Equações	R ²
		0	30	50	80				
INC³									
1 ^a ciclo	0	30,61 a	36,81 b	62,06 a	34,21 b	40,92	25,23	$\hat{Y}_0=27,745+1,0246x-0,0113x^2$ $\hat{Y}_{150}=49,057+2,3523x-0,0285x^2$	0,55 0,74
	150	44,60 a	111,83 a	77,74 a	59,61 a	73,45			
	Média	37,61	74,32	69,90	46,91	57,18			
2 ^a ciclo	0	166,16	111,78	97,60	96,05	117,90 a	32,68	$\hat{Y}_X=116,72$	
	150	113,90	123,71	148,25	76,34	115,55 a			
	Média	140,03	117,74	122,92	86,19	116,72			
IAV³									
1 ^a ciclo	0	27,54	43,99	67,17	44,65	45,84 b	50,09	$\hat{Y}_X=63,78$	
	150	70,30	127,33	65,84	63,41	81,72 a			
	Média	48,92	85,66	66,50	54,03	63,78			
2 ^a ciclo	0	209,42 a	60,74 a	64,68 a	62,52 a	99,34	29,15	$\hat{Y}_0=204,63-5,6239x+0,0488x^2$ $\hat{Y}_{150}=74,11$	0,95
	150	75,04 b	82,99 a	89,08 a	49,34 a	74,11			
	Média	142,23	71,87	76,88	55,93	86,73			
IAPC³									
1 ^a ciclo	0	8,26	8,06	8,77	7,86	8,24 b	52,13	$\hat{Y}_X=16,34$	
	150	24,63	31,29	24,83	17,04	24,45 a			
	Média	16,45	19,67	16,80	12,45	16,34			
2 ^a ciclo	0	4,02	3,31	2,23	1,65	2,80 a	60,20	$\hat{Y}_X=2,36$	
	150	1,56	3,58	1,12	1,41	1,92 a			
	Média	2,79	3,44	1,67	1,53	2,36			

¹kg P₂O₅.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

Crescimento e desenvolvimento de plantas são acompanhados por mudanças nas relações fonte-dreno. Além disso, as plantas, como formas de vida sésseis, desenvolveram mecanismos reguladores que permitem uma resposta flexível no que diz respeito à assimilação da partição para requisitos específicos do habitat, tais como fatores de estresse biótico e abiótico (Roitsch; González., 2004). O sombreamento pode modificar a forma de aquisição de energia luminosa, utilizando mais energia para alongamento de caule e expansão de novas folhas.

Dessa forma, a fotossíntese por unidade de índice de área foliar aumenta em decorrência da adaptação das folhas sombreadas à maior intensidade de luz e da produção de novas folhas (Da Silva & Pedreira, 1997). Porém, os carboidratos produzidos antes do sombreamento são armazenados na base do colmo e, ou raízes, quando há excesso de produção fotossintética.

O sombreamento é considerado um fator estressante para as plantas, já que impede a máxima absorção de luz, afetando assim a otimização dos processos fotossintéticos. Desse modo, os resultados apontam em uma maior atividade das invertases quando as plantas foram sombreadas, devido a maior exigência de degradação da sacarose e translocação dos fotoassimilados, a fim de suprir as exigências metabólicas em diferentes tecidos.

A enzima de isoforma ácida, encontrada predominantemente nos tecidos em expansão e crescimento, estando ligadas a parede celular e está envolvida na partição e distribuição da sacarose fora dos tecidos dreno, no aploplasto, estabelecendo um gradiente de concentração dos tecidos fonte para os drenos (Roitsch; González, 2004; Yao et al., 2009).

A interação não foi significativa ($P > 0,05$) para a atividade da INC e IAPC na raiz. Nesse órgão, a adubação e o sombreamento não diferiram apresentando atividade média de $17,82 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ da INC. No entanto, a maior atividade da IAPC foi observada nas plantas que não receberam adubação, porém o sombreamento não diferiu, apresentando valor médio de $10,46 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em raiz de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare

Adubação ¹	Sombreamentos (%)				Média	CV ²	Equações	R ²
	0	30	50	80				
INC ³								
2 ^a ciclo	0	13,97	16,66	24,77	14,76	17,54 a	35,44	$\hat{Y}_x=17,82$
	150	17,02	17,29	21,88	16,18	18,09 a		
	Média	15,50	16,98	23,33	15,47	17,82		
IAV ³								
2 ^a ciclo	0	15,70 b	24,63 a	25,46 a	28,37 a	23,54	37,74	$\hat{Y}_0=23,54$ $\hat{Y}_{150}=39,547-0,971x+0,0105x^2$
	150	38,88 a	22,58 a	14,70 a	30,05 a	26,55		
	Média	27,29	23,61	20,08	29,21	25,05		
IAPC ³								
2 ^a ciclo	0	11,69	12,35	12,02	11,93	12,00 a	36,04	$\hat{Y}_x=10,46$
	150	6,71	7,70	11,86	9,41	8,92 b		
	Média	9,20	10,02	11,94	10,67	10,46		

¹kg P₂O₅.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

A atividade da IAV na raiz foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$). Em pleno sol, a maior atividade da IAV na raiz foi observada na presença de adubação. O sombreamento apresentou efeito quadrático sob a atividade enzimática nas raízes das plantas adubadas com fósforo, cuja atividade mínima foi de $17,09 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com 46,23% de sombreamento. No entanto, na ausência de adubação a atividade da enzima não diferiu, apresentando atividade média de $23,54 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A relação raiz-parte aérea da planta aumenta quando existe deficiência de P no início do seu desenvolvimento. Isto significa que a redução no crescimento, por efeito da deficiência de P, geralmente é maior na parte aérea da planta que nas raízes, permitindo desta forma manter pelo menos o crescimento radicular para encontrar e extrair P do solo. O crescimento das raízes e da parte aérea é paralela à distribuição do P nestes órgãos (Grant et al., 2001).

Nas raízes, a concentração de invertases sugere que, tanto a adubação quanto o sombreamento, não alteram sua atividade. Desse modo, o fósforo, por ser elemento essencial para desenvolvimento e aumento da densidade das raízes, contribui para a manutenção da eficiência energética no órgão, melhorando a absorção de nutrientes e água através pêlos radiculares.

Sendo assim, o equilíbrio do fósforo disponível para a planta, em diferentes tipos de solo, significa uma retenção de P nas raízes para satisfazer suas necessidades quando o conteúdo de P do solo for baixo, exportação de P para a parte aérea quando ele for suficiente e retenção de P nas raízes quando ele estiver em alta concentração no solo para evitar toxidez de P na parte aérea (Pereira et al., 2015).

Os teores de açúcares redutores na folha (AR_f) foram influenciados pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$) no primeiro ciclo. Em pleno sol, os maiores teores de AR_f foram observados na presença de adubação, enquanto a 80% de sombreamento, os maiores teores foram observados na ausência de adubação. O sombreamento apresentou efeito linear crescente sob os teores de açúcares redutores na folha das plantas que não foram adubadas. Enquanto que nas plantas que receberam adubação, o efeito foi linear decrescente, mostrando que a medida que se aumentou o sombreamento, houve uma redução gradativa dos teores de AR_f . No segundo ciclo, tanto a adubação quanto o sombreamento não diferiram, apresentando teores médios de AR_f $199,56 \mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Tabela 5).

Tabela 5. Teores de açúcar redutor na folha (AR_f), açúcar redutor no caule (AR_c) e açúcar redutor na raiz (AR_r) de Estilosantes Campo Grande cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare em dois ciclos

	Adubação ¹	Sombreamentos (%)				Média	CV ²	Equações	R ²
		0	30	50	80				
Folha³									
1 ^a ciclo	0	146,09 b	170,04 a	178,78 a	274,27 a	192,30	37,67	$\hat{Y}_0 = 130,95 + 1,5337x$	0,84
	150	311,97 a	214,14 a	144,30 a	149,21 b	204,91		$\hat{Y}_{150} = 289,72 - 2,1203x$	0,83
	Média	229,03	192,09	161,54	211,74	198,60			
2 ^a ciclo	0	188,72	219,32	204,75	180,24	198,26 a	17,89	$\hat{Y}_x = 199,56$	
	150	202,91	235,14	179,63	185,78	200,87 a			
	Média	195,82	227,23	192,19	183,01	199,56			
Caule³									
1 ^a ciclo	0	183,02	198,49	225,57	265,03	218,03 a	24,60	$\hat{Y}_x = 226,52$	
	150	194,16	290,26	227,82	227,81	235,01 a			
	Média	188,59	244,38	226,69	246,42	226,52			
2 ^a ciclo	0	222,67	259,34	244,33	217,54	235,97 a	16,38	$\hat{Y}_x = 217,58 + 2,4676x - 0,0324x^2$	
	150	202,28	306,45	234,94	208,37	238,01 a			
	Média	212,48	282,89	239,64	212,96	236,99			
Raiz³									
2 ^a ciclo	0	156,31 a	153,12 a	149,72 a	157,78 a	154,23	8,47	$\hat{Y}_0 = 154,23$	0,89
	150	117,99 b	145,60 a	156,61 a	161,56 a	145,44		$\hat{Y}_{150} = 123,64 + 0,545x$	
	Média	137,15	149,36	153,16	159,67	149,83			

¹kg P₂O₅.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μmol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

A interação não foi significativa ($P>0,05$) para os teores de açúcares redutores no caule (AR_c) no primeiro e segundo ciclo. A adubação não diferiu quanto aos teores AR_c para ambos ciclos, assim como no sombreamento no primeiro ciclo. No entanto, no segundo ciclo, o sombreamento apresentou efeito quadrático com máximo teor de 264,56 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$, em 38,08% de sombreamento.

Os teores de açúcar redutor na raiz (AR_r) foram influenciados pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P<0,05$). Em pleno sol, os maiores teores de AR_r foram observados na presença de adubação, no entanto, os demais sombreamentos não diferiram ($P>0,05$). O sombreamento apresentou efeito linear crescente nos teores AR_r nas plantas que receberam adubação, no entanto as não adubadas, não diferiram, apresentando teor médio de 154,23 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Os teores açúcares redutores na folha demonstram alta atividade fotossintética até 30% de sombreamento. A partir deste nível, os resultados apresentam uma redução desses valores com o aumento do sombreamento, resultante da baixa interceptação luminosa, tendo como consequência, a baixa produção de fotoassimilados. O aumento do sombreamento também sugere a degradação de reservas, uma vez que a taxa fotossintética é reduzida, sendo necessário adaptações fisiológicas para manter o metabolismo e desenvolvimento das plantas.

A interação não foi significativa ($P>0,05$) para a atividade da α -amilase no caule, no primeiro ciclo, assim como a adubação e o sombreamento não diferiram quanto a atividade da α -amilase no caule, apresentando atividade média de 76,45 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Em contrapartida, a atividade da α -amilase no caule no segundo ciclo foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P<0,05$). No segundo ciclo, a maior atividade da enzima foi observada a 0 e 30% de sombreamento nas plantas adubadas, no entanto, a 50 e 80% de sombreamento, a maior atividade foi observada nas plantas não adubadas. Na raiz, a adubação não diferiu, enquanto o sombreamento apresentou efeito quadrático com atividade mínima de 27,77 $\mu\text{mol gli. MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 22,59%. (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade da α e β -amilase em caule e raiz de Estilosantes Campo Grande, cultivado sob diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50, e 80%), com 0 ou 150 kg de fósforo por hectare, em dois ciclos

	Adubação ¹	Sombreamentos (%)				Média	CV ²	Equações	R ²
		0	30	50	80				
α-amilase – Caule³									
1 ^a ciclo	0	39,85	77,09	106,82	154,19	94,49 a	26,01	$\hat{Y}_x=76,45$	
	150	46,65	106,93	45,80	34,28	58,41 a			
	Média	43,25	92,01	76,31	94,24	76,45			
2 ^a ciclo	0	68,48 b	48,67 b	134,94 a	140,52 a	98,15	36,39	$\hat{Y}_0= 54,102+1,1013x$ $\hat{Y}_{150}= 144,77-1,29x$	0,64
	150	131,45 a	142,60 a	54,91 b	43,72 b	93,17			
	Média	99,97	95,64	94,92	92,12	95,66			
α-amilase – Raiz³									
2 ^a ciclo	0	38,77	37,14	28,41	62,02	41,59 a	48,27	$\hat{Y}_x= 31,228-0,4834x+0,0107x^2$	0,99
	150	23,80	15,09	39,58	59,76	34,56 a			
	Média	31,28	26,12	34,00	60,89	38,07			
β-amilase – Caule³									
1 ^a ciclo	0	116,37 a	198,80 a	240,91 a	28,55 a	146,16	43,39	$\hat{Y}_0= 108,83+6,9516x-0,0983x^2$ $\hat{Y}_{150}=79,20$	0,93
	150	62,23 a	124,61 b	70,30 b	59,65 a	79,20			
	Média	89,30	161,70	155,60	44,10	112,68			
2 ^a ciclo	0	60,37	75,02	119,63	96,22	87,81 a	32,12	$\hat{Y}_x= 41,436-1,1694x$	0,89
	150	47,07	43,31	72,53	191,55	88,61 a			
	Média	53,72	59,16	96,08	143,89	88,21			
β-amilase – Raiz³									
2 ^a ciclo	0	30,78 a	26,23 b	31,93 a	33,60 a	30,63	56,23	$\hat{Y}_0=30,63$ $\hat{Y}_{150}= 56,734-0,4067x$	0,56
	150	48,23 a	62,64 a	28,90 a	22,10 a	40,47			
	Média	39,50	44,44	30,41	27,85	35,55			

¹kg P₂O₅.ha⁻¹; ²Coefficiente de Variação; ³ μ mol gli. MF⁻¹.h⁻¹. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

Embora diferentes tipos de enzimas sejam capazes de liberar, *in vitro*, glicanos solúveis a partir de grânulos de amido, acredita-se que a única enzima capaz de o fazer nas plantas seja a α -amilase. Ela apresenta papel central no processo de hidrólise do amido e, por possuir atividade endo-amilolítica, a α -amilase promove alterações marcantes no grão de amido, fornecendo ou aumentando a disponibilidade de substrato para outras enzimas degradativas, sendo a enzima responsável pelo ataque inicial aos grânulos, capaz ainda de degradá-los inteiramente (Beck e Ziegler, 1989; Irving, 1999).

Quando a degradação do amido supera a capacidade de utilização de açúcares, o aumento na concentração dos açúcares solúveis reprime a expressão de genes da α -amilase, atuando como mecanismo de *feedback* negativo, que pode ser encontrado regulando outros genes responsivos à concentração de açúcar ou de outros produtos do metabolismo de carbono (Terashima et al., 1996).

A atividade da β -amilase no caule, no primeiro ciclo e na raiz, foi influenciada pelo sombreamento associado à adubação fosfatada com interação significativa ($P < 0,05$). A maior atividade β -amilase no caule foi observada a 30 e 50% de sombreamento nas plantas não adubadas. O sombreamento apresentou efeito quadrático sob a atividade da β -amilase no caule das plantas não adubadas, com valor máximo de $231,73 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 35,36% e enquanto nas plantas adubadas, o sombreamento não influenciou na atividade da enzima, com valor médio de $79,20 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. No segundo ciclo, a adubação não diferiu quanto a atividade da enzima e o sombreamento apresentou efeito linear decrescente, reduzindo a atividade da enzima à medida que se aumenta o sombreamento.

Na raiz, a atividade da β -amilase foi observada nas plantas adubadas e submetidas a 30% de sombreamento ($P < 0,05$). Os demais sombreamentos não diferiram ($P > 0,05$) quanto a adubação. O sombreamento apresentou efeito linear decrescente na atividade da β -amilase na raiz das plantas adubadas, reduzindo a atividade com o aumento do sombreamento. Já nas plantas não adubadas, o sombreamento não diferiu, apresentando valor médio de $30,63 \mu\text{mol gli. MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A quantidade de α e β -amilase depende de vários fatores: variedade, condições climáticas, tamanho do núcleo embrionário, conteúdo de água mais elevado, temperatura de germinação. Quanto mais elevada a temperatura, mais rápido é o processo (Saika et al., 2005).

A degradação e utilização do amido, considerado a principal fonte de reserva energética, são fundamentais para a manutenção metabólica das plantas. Quando

submetidas ao estresse, corte/pastejo e sombreamento, mecanismos adaptativos são ativados, como o aumento da atividade das enzimas de degradação, a fim de manter a sobrevivência das plantas ou recuperar seu metabolismo natural. No entanto, com a severidade e a persistência do estresse, pode exaurir as reservas tendo como consequência a senescência das plantas.

Desse modo, a área foliar remanescente após desfolhação assume grande importância por aumentar o vigor da rebrotação, resultado da imediata produção de carboidratos pela fotossíntese, fato que proporciona à planta menor tempo de dependência dos carboidratos de reserva como fonte de energia para a sua recuperação. Nesse contexto, para rápida recuperação do dossel, deve-se observar a restauração das reservas orgânicas, a área foliar residual (Brougham, 1956), a interceptação luminosa pelo dossel, as perdas por senescência e respiração (Parsons et al., 1983) e o número de folhas vivas por perfilho (Fulkerson & Slack, 1994).

CONCLUSÕES

A adubação favorece a atividade das invertases, uma vez que o fósforo participa da constituição de diversas moléculas mediadoras da fotossíntese, no entanto o sombreamento não altera diretamente na atividade enzimática. Os teores de açúcares redutores sugerem alta atividade fotossintética em sombreamento de até 30%. A α e β -amilases pouco se alteraram com o sombreamento e adubação, mostrando que ausência de adubação resulta em maior utilização das reservas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, V. H.; RIBEIRO, A. C. Calagem. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais (CFSMG). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª aproximação, Viçosa, p. 41-60, 1999.

BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G.B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.51-67, 2008. Supl.

BECK, E., ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. **Annual Review Plant Physiology And Plant Molecular Biology**. V.40, p.95-117, 1989.

BROUGHAM, R.W. Effect of intensity of defoliation on regrowth of pasture. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, v. 7, n. 5, p. 377-387, 1956. <https://doi.org/10.1071/AR9560377>.

CAZETTA, J. O.; SEEBAUER, J. R.; BELOW, F. E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. **Annals of Botany**, London, v. 84, n. 6, p. 747-754, 1999.

CLARK, S. C.; HAYES, P. M.; HENSON, C. A. Effects of single nucleotide polymorphisms in β -amylase1 alleles from barley on functional properties of the enzymes. **Plant physiology and biochemistry**, v. 41, n. p. 798-804, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Estilosantes Campo Grande. **Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande, MS. V.2, n. 38, p. 1-9. 2000.

ESCHRICH, W. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, n.93, p.363-378, 1980.

FRANKLIN, K.A.; WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, v. 96, n. 2, p. 169– 175, 2005.

FRIES, D. D. **Comportamento de α amilase/invertases e mudanças anatômicas associadas ao cálcio exógeno no período de germinação e/ou alagamento de plântulas do milho** (*Zea mays* L.) “Saracura” – BRS-4154. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, p. 49, 2003.

FULKERSON, W. J.; SLACK, K. Leaf number as a criterion for determining defoliation time for *Lolium perenne*, 1. Effect of water-soluble carbohydrate and senescence. *Grass and Forage Science*, Oxford, v. 49, n. 4, p.373-377, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1994.tb02013.x>.

GRANT, C.A.; FLATEN, D.N.; TOMASIEWICZ; D.J.; SHEPPARD.; S.C. The importance of phosphorus initial development of the plant. **Better Crops with Plant Food**, Norcross, n.2, 2001.

IRVING, D. E. Starch degradation in buttercup squash. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. v.124, n.6, p.587-590, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHAN, B.H.; GOPAL, A.; MALLESHI, N.G.; THARANATHAN, R.N. Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed ragi (*Eleusine coracana*) and rice (*Oryza sativa*) starches. *Carbohydrate polymers*. V.59, p.43-50, 2005.

PARSONS, A.J.; LEAFE, E.L.; COLLETT, B.; PENNING, P.D.; LEWIS, J. The physiology of grass production under grazing. II. Photosynthesis, crop growth and animal intake of continuously-grazed swards. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v. 20, p. 127-139. 1983. <https://doi.org/10.2307/2403381>.

PEREIRA, M.M; REZENDE, C.P; PEDREIRA, M.S; PEREIRA, J.M; MACEDO, T.M; SILVA, H.G.O; BORGES, A.M.F; SILVA, A.M.P. Valor alimentício do capim marandu, adubado ou consorciado com amendoim forrageiro, e características da carcaça de bovinos de corte submetido à pastejo rotacionado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*., v.16, n.3, p.643-657, 2015.

ROITSCH T, GONZÁLEZ MC. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*. v.9, n.12, p. 606-613. 2004.

SAIKA, H.; NAKAZONO, M.; IKEDA, A.; YAMAGUCHI, J.; MASAKI, S.; KANEKATSU, M., NEMOTO, K. A transposon-induced spontaneous mutation results in low α -amylase activity in rice. *Plant Science*, v.169, p.239-244, 2005.

SHONIESKI, F.R.; VIÉGAS, J.; BERMUDEZ, R.F. Composição botânica, estrutural e valor nutritivo de pastagens de azevém consorciadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.40, n.6, p.550-556, 2011.

SKADSEN, J. Nitrification in a distribution system. *Journal AWWA*. V.85, n.7, p.95, 1993.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. *SAS/STAT User's Guide*. Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute, 2017.

TERASHIMA, M., HAYASHI, N., THOMAS, B.R, RODRIGUEZ, R.L., KATOH, S. Kinetic parameters of two rice α -amylase isozymes for oligosaccharide degradation. *Plant Science*. v.116, p.9-14, 1996.

YAO, X. J.; VÉLEZ G.; WHORTON, M. R.; RASMUSSEN, S. G.; DEVREE, B. T.; DEUPI, X.; SUNAHARA, R. K.; KOBILKA, B. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V.106, p. 9501-950, 2009.

ZENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W. T.; KOCH, K. E. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertases/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant Physiology*, v.121, n. 2, p. 599-608, 1999.

V – CAPÍTULO III

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM ESTILOSANTES CAMPO GRANDE SOB DOIS SISTEMAS DE CULTIVO E ADUBAÇÃO NITROGENADA

RESUMO- Objetivou-se verificar a atividade das invertases em Estilosantes cv. Campo Grande, sob influência do sistema de cultivo e adubação nitrogenada, em duas estações. O experimento foi conduzido em uma área de Capim Xaraés, onde o Estilosantes foi implantado e submetido a um esquema fatorial 2x2, sendo dois sistemas de cultivo (monocultura e consórcio) e ausência ou presença de adubação (75 kg de N.ha⁻¹). Utilizou-se delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. A atividade das invertases neutra do citosol (INC), ácida do vacúolo (IAV) e ácida da parede celular (IAPC) e os teores de açúcares redutores, nas folhas e caules, foram avaliados e analisados pelo teste F, a 5% de probabilidade. A interação entre sistema de cultivo e adubação nitrogenada foi significativa para INC, nas folhas, no verão, de forma que maior atividade ocorreu em função do consórcio e da adubação nitrogenada. O nitrogênio aumentou a atividade da INC, no caule, nos dois períodos e da IAV na folha, no verão, bem como diminuiu a IAPC, no outono. O sistema de cultivo influencia a atividade da INC, independente do período do ano e não interfere nas atividades das invertases ácidas. As invertases não apresentam alterações regulares em relação a adubação nitrogenada.

Palavras-chave: carboidratos, consórcio, fotoassimilados, leguminosas, nitrogênio

**METABOLISM OF CARBOHYDRATES IN ESTILOSANTES CAMPO
GRANDE UNDER DIFFERENT SYSTEMS OF CULTIVATION AND
NITROGEN FERTILIZATION**

Abstract: The objective of this study was to verify the activity of the invertases in Estilosantes under influence of the cultivation system and nitrogen fertilization in two seasons. The experiment was conducted in the Xaraés area, where Estilosantes was implanted and submitted to the 2x2 factorial scheme, being two cultivation systems (monoculture and mixed-pasture) and absence or presence of fertilization (75 kg of N.ha⁻¹). A randomized block design, four replications, was used. The neutral cytosol (Inv-N), vacuole acid (Inv-V) and cell wall acid (Inv-CW) invertase activity and reducing sugar contents in the leaves and stems were evaluated and analyzed by the 5% probability F test. The interaction between cultivation system and nitrogen fertilization was significant for Inv-N, in the leaves, in the summer, so that greater activity occurred as a function of the consortium and nitrogen fertilization. Nitrogen increased activity of Inv-N, in the stem, in both periods and Inv-V in leaf, in summer, as well as decreased Inv-CW in the fall. The cultivation system influences the activity of the Inv-N, regardless of the period of the year and does not interfere with the activities of the acid invertases. The invertases do not show regular changes in relation to nitrogen fertilization.

Keywords: carbohydrates, legumes, mixed pasture, nitrogen, photoassimilates

INTRODUÇÃO

O extrativismo, principal forma de exploração da pecuária no Brasil, vem causando danos tanto na degradação das pastagens quanto do solo, devido à não reposição dos nutrientes retirados pelas plantas. O esgotamento da fertilidade nos solos acarreta problemas desde as características físicas e químicas, até a qualidade da forragem ali produzida, reduzindo a oferta de alimento para o animal, prejudicando seu desempenho (Barcellos. et al., 2008).

Embora o uso de adubação, em especial a nitrogenada, tenha melhorado o desempenho produtivo das forrageiras, sua utilização tem sido limitada, devido aos custos elevados dos fertilizantes químicos, da disponibilidade pluviométrica da região e da frequente necessidade de aplicação (Martha Jr. et al., 2006).

A consorciação das gramíneas com leguminosas pode favorecer o sistema, uma vez que, ao fixar o nitrogênio através da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, este nutriente pode ser disponibilizado para as gramíneas, mantendo a produtividade e sustentabilidade do sistema com custos reduzidos e por períodos mais longos.

A produtividade depende do metabolismo das plantas, incluindo, principalmente, os processos de fotossíntese e translocação na produção e distribuição de carboidratos. As plantas apresentam diferentes tipos de carboidratos, solúveis e insolúveis, de reserva e estruturais, e a predominância destes nos tecidos, bem como a sua estrutura química, variam entre espécies, órgãos, tecidos e células, além de variar ao longo do dia e das diferentes estações do ano (Souza. et al, 2005).

Após a síntese da glicose pela fotossíntese, é necessário que ela seja enviada aos órgãos dreno para ser utilizada no crescimento ou reserva. Assim, a glicose é metabolizada em sacarose para que possa ser transportada (Taiz et al, 2017). O metabolismo da sacarose é vital no ciclo de vida da planta e sua utilização como fonte de energia e de carbono requer sua hidrólise. As enzimas invertases quebram a sacarose em hexoses, disponibilizando às células, os carboidratos para o processo de respiração, com a finalidade de produção de energia e síntese de compostos destinados ao crescimento e desenvolvimento. As invertases podem ainda estar envolvidas no transporte de sacarose a longas distâncias por criar o gradiente de concentração desse carboidrato entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema (Eschrich, 1980; Roitsch; González, 2004).

As enzimas invertases são encontradas em diversas isoformas, com diferentes propriedades bioquímicas e localização subcelular: invertase neutra do citosol, invertase ácida do vacúolo e invertase ácida de parede celular (Tymowska-Lalanne E Kreis, 1998; Rohwer; Botha, 2001).

Todavia, estudos do metabolismo do carbono, envolvendo as invertases, bem como a caracterização dos efeitos do sistema de cultivo e adubação nitrogenada sobre a atividade dessas enzimas em plantas forrageiras são escassos. Assim, objetivou-se verificar a atividade das invertases em plantas de Estilosantes Campo Grande, sob influência do sistema de cultivo e adubação nitrogenada, em duas estações do ano.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período de novembro de 2013 a junho de 2015 em uma área de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés já estabelecida há 6 anos, pertencente ao setor de Bovinicultura de Leite da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus “Juvino Oliveira”, no município de Itapetinga – BA, situado nas seguintes coordenadas: 15°38’46” de latitude sul, 40°15’24” de longitude oeste e altitude média de 280 m. O clima do município, de acordo com a classificação köppen, é do tipo “Cw”, mesotérmico úmido e sub-úmido quente.

Os dados meteorológicos durante o período experimental foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e apresentados do dia 21 de um mês até o dia 20 do mês seguinte (Figura 1).

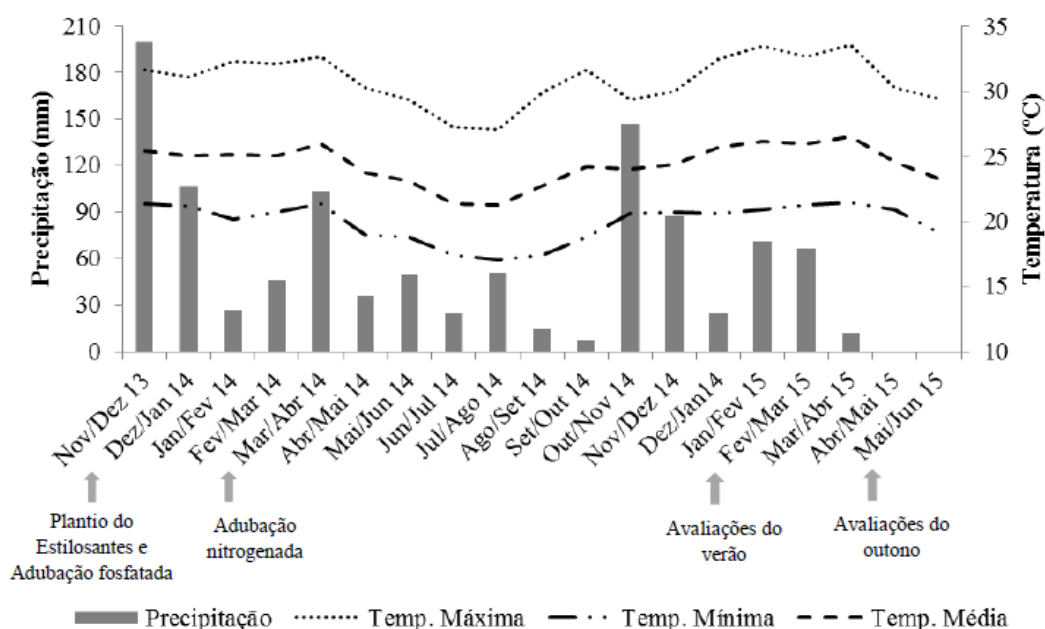


Figura 1. Precipitação (mm) e temperatura (°C) máxima, mínima e média durante o período experimental (nov/13 – jun/15). Fonte: INMET.

A cultivar Estilosantes cv. Campo Grande (Estilosantes) foi avaliada e submetido à um esquema fatorial 2 x 2, o qual apresentou dois sistemas de cultivo: 1- Estilosantes solteiro e 2- Estilosantes consorciado com capim Xaraés, sendo cada sistema de cultivo avaliado na ausência de adubação nitrogenada e com uma dose de 75 kg de nitrogênio por hectare.

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, o que totalizou 16 parcelas de 4 m de largura por 3 m de comprimento (12 m²), com o espaçamento de 50 cm entre linhas no consórcio e 30 cm entre linhas nas parcelas de leguminosa solteira.

Em novembro de 2013, iniciou-se o preparo da área, rebaixando o Capim Xaraés a 5 cm do solo. Em seguida, foram realizadas a demarcação das parcelas, abertura dos sulcos nas parcelas que receberam o sistema de cultivo consorciado e limpeza e abertura dos sulcos das parcelas onde foi semeado o Estilosantes solteiro.

A coleta da amostra de solo foi realizada camada de 0-20 cm, de profundidade em zigue-zague pela área experimental, onde foram coletadas dez amostras simples e as mesmas misturadas para se obter a amostra composta, que foi enviada ao Laboratório de Solos do Departamento de Engenharia Agrícola e Solos da UESB, para a realização das análises física (Tabela 1) e química (Tabela 2) do solo.

Tabela 1. Análise física do solo

Composição granulométrica (g/kg)			Classe textual
Areia	Silte	Argila	Franco arenosa
805	55	140	

Fonte: Laboratório de solos UESB.

Tabela 2. Análise química do solo

Ph	*mg/dm ³	*cmol/dm ³ de solo.....										%	g/dm ³
(H ₂ O)	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺	Na ⁺	S.B ¹	t ²	T ³	V ⁴	m ⁵	M.O. ⁶
5,8	16	0,70	1,6	1,0	0,2	2,2	-	3,3	3,5	5,7	58	6	16

¹Soma de bases. ²CTC efetiva. ³CTC pH 7. ⁴Saturação por bases. ⁵Saturação por Al³⁺. ⁶Matéria orgânica.
Fonte: Laboratório de solos da UESB.

Conforme os resultados da análise de solo e seguindo as recomendações da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (Alvarez & Ribeiro, 1999), sendo adotado o médio nível tecnológico, não houve necessidade de calagem, já que o solo apresentou uma saturação por bases de 58%. De acordo com as recomendações de Cantarutti et al. (1999), não foi preciso realizar a adubação com potássio, o qual se encontrava com boa disponibilidade. Por outro lado, o fósforo apresentou-se com disponibilidade baixa, sendo necessária a aplicação, a lanço no momento do plantio, de 50 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, o que correspondeu a 278 kg.ha⁻¹ de Super Simples (333 g/parcela).

Em dezembro de 2013, logo após a adubação fosfatada, foi realizada a semeadura manual do Estilosantes. Foi utilizado no consórcio 3 kg.ha⁻¹ de sementes puras e viáveis (7,6 g de sementes/parcela) e 5 kg.ha⁻¹ de sementes puras e viáveis para o sistema de cultivo solteiro (12,7 g de sementes/parcela). A semente utilizada possuía 95% de pureza e 60% de germinação.

As parcelas foram mantidas limpas por meio de capina manual, para que não houvesse interferência de invasoras no estabelecimento da leguminosa. Em março 2014, três meses após o plantio, foi realizado o corte de uniformização a 15 cm do solo, com

auxílio de tesoura de poda e, em seguida, foi realizada manualmente a adubação nitrogenada com ureia, correspondendo a 75 kg de nitrogênio por hectare, nas parcelas que receberam esse tratamento.

As avaliações das atividades enzimáticas foram realizadas nos períodos medianos de verão (dezembro de 2014 a março de 2015), sendo considerado como período chuvoso, e de outono (março a junho de 2015), sendo considerado o período seco, de acordo com os dados meteorológicos disponibilizados pelo INMET.

As coletas foram realizadas nos dias 02 de março e 01 de junho do ano de 2015. Foram coletadas a terceira ou quarta folha completamente expandida e partes medianas de caule de quatro plantas. No momento das coletas, o material vegetal foi alocado em sacos de papel alumínio, previamente identificados e posteriormente imersos em nitrogênio líquido para paralisar a atividade enzimática. Todo o material foi armazenado em freezer a -80°C para, em seguida, serem feitas as análises da atividade enzimática.

A extração e incubação das invertases solúveis, invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase neutra do citossol (INC) foram realizadas conforme descrito por Zeng et al. (1999), e a invertase insolúvel, invertase ácida da parede celular (IAPC), segundo Cazetta et al. (1999), ambas modificadas por Fries et al. (2003).

A IAV e INC foram extraídas pela maceração e homogeneização de 250 mg de massa fresca em 1,8 mL do tampão de extração gelado, contendo 100 mM de fosfato de potássio (pH 7,5), 5 mM MgCl_2 e 20 mM de ácido ascórbico, seguido pela centrifugação a 9.000 g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C . O sobrenadante foi coletado para incubação da IAV e INC.

Para a extração da IAPC, o pellet foi ressuspendido e homogeneizado por 7 minutos, com 1 mL do seguinte tampão: 200 mM citrato de sódio (pH 4,8), 5 mM MgCl_2 , 20 mM de ácido ascórbico e 1 M NaCl. Em seguida, realizou-se uma nova centrifugação a 9.000 g por 20 minutos e temperatura de 4°C . O sobrenadante foi coletado para incubação da IAPC.

A atividade das enzimas foi realizada em meio de reação contendo 100 mM de fosfato de potássio (pH 7,5) e 0,5 mM MgCl_2 para INC e contendo 200 mM de citrato de sódio (pH 4,8) e 0,5 mM MgCl_2 , para IAV e IAPC ambos acrescidos de 200 mM de sacarose.

A incubação foi realizada nos tempos zero (T0) e sessenta minutos (T60). Para o T0, 200 μL da amostra foram homogeneizadas em eppendorf e a reação, imediatamente, foi paralisada em gelo. Reações há 0 minutos foram determinadas para eliminar os

açúcares redutores pré-existentes. Para o T60, 200 μL da amostra foram homogeneizadas em eppendorf e a incubação foi realizada em banho-maria, a 30°C , por 60 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada em gelo.

A atividade das enzimas foi determinada pelo produto final, quantificando-se os açúcares redutores pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). A atividade das enzimas foi obtida pela diferença dos valores após 60 minutos de incubação daqueles T0. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol gli.g}^{-1} \text{MF.h}^{-1}$.

Os açúcares redutores foram obtidos a partir do extrato das invertases solúveis e a quantificação foi realizada pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as medidas comparadas por meio do teste F onde foi adotado, para ambos os testes, o nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Statistical Analysis System – SAS versão 9.2 (SAS, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre sistema de cultivo e adubação nitrogenada foi significativa ($P < 0,05$) somente para atividade da invertase neutra do citosol (INC), nas folhas de plantas Estilosantes, no período de verão.

A maior atividade da INC na folha foi influenciada pelo sistema de cultivo consorciado, associado à presença da adubação nitrogenada. No geral, o sistema de cultivo consorciado, tanto na ausência quanto na presença da adubação nitrogenada, se sobressaiu em relação ao sistema solteiro, com maior atividade da INC na folha. Entretanto, no caule, houve diferença significativa apenas para adubação, de forma que a presença da adubação influenciou positivamente no aumento da atividade da invertase citoplasmática.

A atividade da INC nas plantas, atuando predominantemente nos tecidos maduros e completamente expandidos, sofre alterações em relação ao desenvolvimento da planta. De acordo com as informações, estudos relatam que há alterações de intensidade significativas nos níveis enzimáticos das invertases neutra e ácidas, quando em diferentes estágios de maturação (Leite et al., 2009).

Para Koch (2004), a invertase neutra ou alcalina, localizada no citoplasma, é considerada uma enzima de manutenção, uma vez que está envolvida na degradação da sacarose quando as atividades da invertase ácida da parede celular e sacarose sintase estão baixas. Deste modo, os valores encontrados neste trabalho corroboram com o autor citado, visto que a atividade das invertases ácidas apresenta-se inferior à atividade da invertase neutra.

Quanto a atividade da invertase ácida no vacúolo (IAV), houve diferença significativa ($P < 0,05$) para adubação, apenas na folha. Já a atividade da invertase ácida da parede celular (IAPC) não apresentou diferença significativa para sistema de cultivo ou adubação, tanto na folha quanto no caule de plantas Estilosantes, no período de verão.

A adubação influenciou positivamente sobre a atividade IAV na folha, enquanto que o sistema de cultivo não apresentou alteração na atividade desta enzima. No caule, não houve diferença em função da adubação nem do sistema de cultivo (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folhas e caules de Estilosantes Campo Grande, cultivado solteiro ou consorciado, sem (0) ou com 75 kg de nitrogênio por hectare, no período do verão.

Sistema de cultivo	Adubação (kg.ha ⁻¹)		Médias	CV ¹	
	0	75			
INC (μmol gli.g ⁻¹ MF.h ⁻¹)					
Folha	Solteiro	48,85 aB	47,88 aB	48,36	15,10
	Consortiado	97,15 bA	135,66 aA	116,41	
	Média	73,00	91,77	82,38	
Caule	Solteiro	26,96	98,00	62,48 A	53,01
	Consortiado	62,80	145,34	104,07 A	
	Média	44,88 b	121,67 a	83,28	
IAV (μmol gli.g ⁻¹ MF.h ⁻¹)					
Folha	Solteiro	35,25	44,15	39,70 A	24,68
	Consortiado	32,65	56,80	44,73 A	
	Média	33,95 b	50,48 a	42,21	
Caule	Solteiro	75,57	52,63	64,10 A	44,51
	Consortiado	77,55	119,02	98,29 A	
	Média	76,56 a	85,83 a	81,19	
IAPC (μmol gli.g ⁻¹ MF.h ⁻¹)					
Folha	Solteiro	50,47	43,38	46,93 A	44,59
	Consortiado	15,05	41,59	28,32 A	
	Média	32,76 a	42,49 a	37,62	
Caule	Solteiro	33,58	45,63	39,61 A	45,02
	Consortiado	28,54	19,72	24,13 A	
	Média	31,06 a	32,68 a	31,87	

¹Coefficiente de Variação. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha, diferem entre si (p<0,05). Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

A atividade dessa enzima está relacionada com o armazenamento de açúcares, regulação osmótica e respostas a estresses abióticos. Além disso, a invertase vacuolar pode controlar a rota primária de clivagem da sacarose em tecidos em expansão ou maduros, contribuindo para o fluxo de hexoses através do tonoplasto, intermediando a entrada destas no metabolismo citoplasmático (Roitsch; González, 2004; Yao et al., 2009).

A adubação nitrogenada favorece o desenvolvimento da planta, sendo o nitrogênio o principal nutriente para manutenção da produtividade das gramíneas forrageiras (Costa et al., 2006), onde o mesmo promove aumentos no alongamento foliar, no número de folhas verdes, na formação de gemas axilares e na taxa de perfilhamento (Silva et al., 2008), o que garante maiores produções de massa seca e maior renovação da população de perfilhos.

Deste modo, o aumento da atividade da IAV na folha, com a degradação da sacarose, sugere um maior requerimento de carbono (hexoses) para suprir necessidade de energia, tanto para crescimento quanto para formação de novas folhas e perfilhos.

O metabolismo nas folhas responde às necessidades de energia e crescimento da planta, de forma que há uma sincronia entre órgãos fonte e órgãos dreno. Altos teores de carboidratos nas folhas promovem o crescimento da planta e o armazenamento de carboidratos em órgãos de reserva (Taiz et al., 2017).

A interação entre sistema de cultivo e adubação nitrogenada foi significativa ($P < 0,05$) somente para a atividade da invertase neutra do citosol (INC) na folha de plantas de Estilosantes, no período de outono. Já no caule, apesar da interação não ser significativa, houve diferença para o sistema de cultivo e a adubação (Tabela 4).

Ao contrário do que ocorreu no verão, na estação de outono, houve maior influência da atividade da INC na folha quando as plantas foram cultivadas solteiras em associação à presença da adubação nitrogenada. Já no caule, a maior atividade dessa enzima foi no sistema de cultivo consorciado e a adubação nitrogenada influenciou em maior atividade da INC.

A invertase citoplásmica, que apresenta maior atividade em tecidos, cuja expansão já foi finalizada, é importante na diferenciação dos estádios de desenvolvimento da planta. A modificação dos drenos ocorre durante o processo florescimento, onde há um maior requerimento energético para a formação de sementes e/ou frutos. De acordo com Schunke. et al., (2000), o estilosantes inicia seu período reprodutivo em abril e finaliza em maio, com a maturação das sementes, onde sofre grande influência do fotoperiodismo, o que se explica os valores encontrados neste trabalho.

Tabela 4. Atividade de invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida do vacúolo (IAV) e invertase ácida da parede celular (IAPC) em folhas e caules de Estilosantes Campo Grande, cultivado solteiro ou consorciado, com 0 ou 75 kg de nitrogênio por hectare no período do outono

	Sistema de cultivo	Adubação (kg.ha ⁻¹)		Médias	CV ¹
		0	75		
INC (μmol gli.g ⁻¹ MF.h ⁻¹)					
Folha	Solteiro	34,02 bA	73,71 aA	53,86	31,87
	Consortiado	37,16 aA	36,90 aB	37,03	
	Média	35,59	55,31	45,45	
Caule	Solteiro	25,90	81,75	53,82 B	21,57
	Consortiado	113,77	194,14	153,95 A	
	Média	69,83 b	137,95 a	103,89	
IAV (μmol gli.g ⁻¹ MF.h ⁻¹)					
Folha	Solteiro	90,18	120,46	105,32 A	20,76
	Consortiado	83,21	97,26	90,24 A	
	Média	86,70 a	108,86 a	97,78	
Caule	Solteiro	126,08	105,94	116,01 A	38,05
	Consortiado	84,38	106,00	95,19 A	
	Média	105,23 a	105,97 a	105,60	
IAPC μmol gli.g ⁻¹ MF.h ⁻¹)					
Folha	Solteiro	55,35	27,96	41,66 A	42,74
	Consortiado	47,88	24,61	36,25 A	
	Média	51,62 a	26,28 b	38,95	
Caule	Solteiro	40,53	25,03	32,78 A	33,85
	Consortiado	67,63	24,64	46,14A	
	Média	54,08 a	24,84 b	39,46	

¹Coefficiente de Variação. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha, diferem entre si (p<0,05). Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna, diferem entre si (p<0,05).

A atividade da invertase ácida do vacúolo (IAV), tanto na folha quanto no caule, não apresentou diferença significativa entre sistema de cultivo e adubação. Entretanto, a invertase ácida da parede celular (IAPC), teve influência significativa apenas para adubação, tanto na folha quanto no caule, de forma que o nitrogênio reduziu suas atividades.

Os carboidratos são oriundos da redução do carbono, ocorrente na etapa bioquímica da fotossíntese e possuem diversas atribuições no metabolismo vegetal, dentre elas o armazenamento e translocação de carbono; e a proteção contra condições adversas, como a restrição ou excedente hídrico, alta salinidade e temperaturas extremas (Keller; Pharr, 1996).

A sacarose, por ser de natureza não redutora, pode ser translocada e armazenada nos vacúolos celulares, não sendo metabolizada até que seja necessário (Souza et al., 2005). Assim, na estação de outono, de acordo com os dados meteorológicos fornecidos

pelo INMET, em meados de abril até meados de junho, as condições climáticas sofreram fortes oscilações, com baixas temperaturas e ausência de precipitações. Essas condições causaram variações principalmente na intensidade da atividade da invertase ácida do vacúolo, que está relacionada aos processos de osmorregulação em condições de deficiência hídrica. Mesmo assim, essa enzima não foi influenciada pelo sistema de cultivo ou pelo nitrogênio.

A atividade das invertases ácidas do vacúolo e da parede celular pode ser alta ou baixa, respectivamente, em condições favoráveis ao crescimento ou em condições desfavoráveis, como por exemplo, estresse hídrico, fotoperíodo curto e temperaturas baixas (Gayler & Glasziou, 1972; Legendre, 1975). As flutuações, nos teores de açúcar, durante o crescimento vegetal, é consequência do nível da enzima invertase ácida (Gayler & Glasziou, 1972; Lingle, 1999), uma vez que esta apresenta relação estreita e inversa com o conteúdo de sacarose e açúcares totais, corroborando com outros autores (Hawker, 1985; Su et al., 1992; Zhu et al., 1997; Terauchi et al., 2000).

Pesquisadores observaram a redução na atividade desta enzima sob condições de baixas temperaturas e com a ocorrência do processo de maturação, como na cana-de-açúcar, correlacionando-a com o aumento na concentração de sacarose no colmo (Zhu et al., 1997; Echeverria, 1998; Terauchi et al., 2000). Todavia, Rose e Botha (2000) demonstraram correlação significativa entre o teor de sacarose e o nível de invertase neutra.

Quanto aos teores de açúcares redutores, a interação não foi significativa ($P > 0,05$) entre sistemas de cultivo e adubação, tanto nos componentes da planta quanto nas estações. Para o sistema de cultivo e a adubação, não houveram diferenças significativas nos componentes da planta de Estilosantes, nas estações avaliadas de outono e verão.

Como não houve variação nos teores de açúcares redutores, as alterações que ocorreram em função do consórcio ou do nitrogênio na atividade das invertases, tanto no verão como no outono, podem ter sido para manter as concentrações de açúcares redutores necessários às atividades celulares (Tabela 5).

Tabela 5. Teores de açúcares redutores em folhas e caules de Estilosantes Campo Grande, cultivado solteiro ou consorciado, com 0 ou 75 kg de nitrogênio por hectare, nos períodos do outono e verão

Sistema de cultivo	Adubação (kg.ha ⁻¹)		Médias	CV ¹	
	0	75			
Verão					
Folha	Solteiro	187,21	157,79	172,50 A	16,37
	Consortiado	159,56	150,90	155,23 A	
	Média	173,39 a	154,35 a	163,87	
Caule	Solteiro	258,99	312,28	285,64 A	35,30
	Consortiado	309,52	304,96	307,24 A	
	Média	284,26 a	308,62 a	296,44	
Outono					
Folha	Solteiro	303,63	300,77	302,20 A	22,83
	Consortiado	224,35	234,86	229,61 A	
	Média	263,99 a	267,82 a	265,90	
Caule	Solteiro	273,50	357,57	315,53 A	21,26
	Consortiado	224,76	303,87	264,32 A	
	Média	249,13 a	330,72 a	289,92	

¹Coefficiente de Variação. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha, diferem entre si ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna, diferem entre si ($p < 0,05$).

De acordo com Vilhar et al (2002), há evidências de que os açúcares funcionam não apenas como compostos energéticos ou precursores de outros componentes celulares, mas também como sinais dentro de tecidos definidos para manter um estágio distinto de diferenciação ou para prosseguir dentro do programa de desenvolvimento, indicando que as invertases desempenham um papel crucial na geração dos sinais metabólicos.

CONCLUSÕES

O sistema de cultivo influencia a atividade da invertase neutra do citosol de plantas de Estilosantes cv. Campo Grande, independente do período do ano. Entretanto, não interfere nas atividades das invertases ácidas. As invertases ácidas do vacúolo e da parede celular não apresentam alterações regulares em relação a adubação nitrogenada, de forma que podem aumentar ou reduzir sua atividade quando as plantas são cultivadas nessas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, V. H.; RIBEIRO, A. C. Calagem. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais (CFSMG). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª aproximação, Viçosa, p. 41-60, 1999.

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VIELA, L.; MARTHA JR, G. B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n. spe. 2008.

CANTARUTTI, R. B.; MARTINS, C. E.; CARVALHO, M. M. de; FONSECA, D. M. da; ARRUDA, M. L.; VILELA, H.; OLIVEIRA, F. T. T. de. Pastagens. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais (CFSMG). **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª aproximação, Viçosa, 1999, p.332-341.

CAZETTA, J. O.; SEEBAUER, J. R.; BELOW, F. E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. **Annals of Botany**, London, v. 84, n. 6, p. 747-754, 1999.

COSTA, K.A. de P.; OLIVEIRA, I.P. de; FAQUIN, V. **Adubação nitrogenada para pastagens do gênero *Brachiaria* em solos do Cerrado**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. doc. 192.2006.

ECHEVERRIA, E. acid invertase (sucrose hydrolysis) is not required for sucrose mobilization from the vacuole. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.104, p.17-21,1998.

ESCHRICH, W. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, n.93, p.363-378, 1980.

FRIES, D. D. **Comportamento de α amilase/invertases e mudanças anatômicas associadas ao cálcio exógeno no período de germinação e/ou alagamento de plântulas do milho (*Zea mays* L.) “Saracura” – BRS-4154**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, p. 49, 2003.

GAYLER, K.R.; GLASZIOU, K.T. Physiological functions of acid and neutral invertases in growth and sugar storage in sugar cane. **Physiology Plant**, v.27, p.25-31, 1972.

HAWKER, J.S. Sucrose. In: DEY, P.M.; DIXEN, R.A. (Eds.). **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic, 1985. p.1-48.

KELLER, F. & PHARR, D.M. Metabolism of carbohydrates in skins and sources. Galactosyl-sucrose. Pp. 157-184. In: **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York, Marcel Dekker. Inc. 1996.

KOCH, K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Plant Biology**. v.7 n.3, 235-246. (2004).

LEITE, G. H. P.; Crusciol, C. A. C.; Lima, G. P. P.; Silva, M. A. Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, v.39, n.3, 2009.

LEGENDRE, B.L. Ripening of sugarcane: effects of sunlight, temperature, and rainfall. **Crop Science**, v.15, p.349-352, 1975.

LEWIS, D. H. Stronge carbohydrates in vascular plants: distribution, physiology and metabolismo. **London, Cambridge University**. 1984.

LINGLE, S.E. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. **Crop Science**, v.39, p.480-486, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

ROHWER, J.M.; BOTHA, F.C. Analysis of sucrose accumulation in the sugarcane culm on the basis of in vitro kinetic data. **Biochemistry Journal**, New York, v.358, p.437-445, 2001.

ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, v.9, n.12, 2004.

ROSE, S.; BOTHA, F.C. Distribution patterns of neutral invertase and sugar content in sugarcane intermodal tissues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.819-824, 2000.

SILVA, S.C. da; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; EUCLIDES, V.B.P. **Pastagens: conceitos básicos, produção e manejo**. Viçosa: Suprema, 2008. 115p.

SOUZA, A.; MORAES, M. G.; RIBEIRO, R.C.L.F. Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. **Acta bot. Bras.** 19(1): 81-90. 2005.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS/STAT User's Guide**. Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute, 2009.

SCHUNKE, R. M.; VALLE, L. C. S.; ZIMMER, A. H.; FERNANDES, C. D.; MACEDO, M. C. M.; VALÉRIO, J. R.; SILVA, J. M. **Estilosantes Campo Grande: Estabelecimento, Manejo e Produção Animal**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico n.61, p. 1-8, 2000.

SU, L. Y.; CRUZ, A. D.; MOORE, P. H.; MARETZKI, A. The relationship of glyphosate treatment to sugar metabolism in sugarcane: new physiological insights. **J Plant Physiol**, n.140, p. 168-173, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.A.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. (6. Ed) Porto Alegre: SC. 2017.

TERAUCHI, T. KUBOTA, N. TOBE, K. TERAUCHI, Y. ETO, K. YAMAUCHI, T.; SUZUKI, R. Activity of sucrose phosphate synthase in relation to sucrose concentration

in sugarcane internodes. **Japan Journal Tropical Agriculture**, Tokyo, v.44, n.3, p.141-151, 2000.

TYMOWSKA-LALANE, Z.; KREIS, M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. **Advance Botanical Research**, Chicago, v.28, p.71-117, 1998.

VILHAR, B.; KLADNIK, A.; BLEJEC, A.; PREM, S.; CHOUREY, M. D. Evidências citométricas de que a perda de peso de sementes no mutante de sementes *miniatural* do milho está associada com uma atividade mitótica reduzida no endosperma em desenvolvimento. **Plant Physiology**, 129 (2002), pp. 23-30.

YAO, X. J.; VÉLEZ G.; WHORTON, M. R.; RASMUSSEN, S. G.; DEVREE, B. T.; DEUPI, X.; SUNAHARA, R. K.; KOBILKA, B. . Analysis of rice SHORT-ROOT5 gene revealed functional diversification of plant neutral/alkaline invertase Family. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 5, p.627-634, 2009.

ZENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W. T.; KOCH, K. E. Rapid repression of maize invertases by low oxugem. Invertases/sucrose synthase balance, sugar signaling potencial, and seedling survival. **Plant Physiology**, v.121, n. 2, p. 599-608, 1999.

ZHU, Y.J.; KOMOR, E.; MOORE, P.H. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. **Plant Physiology**, Bethesda, v.115, p.609-616, 1997.