

ATIVIDADE DE PROTEASES E DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO PARA LARANJEIRA CULTIVADA EM LATOSSOLO VERMELHO DISTRÓFICO⁽¹⁾

E. T. SILVA⁽²⁾ & W. J. MELO⁽³⁾

RESUMO

O conhecimento do potencial da mineralização dos compostos orgânicos nitrogenados do solo é fundamental para o uso eficiente do N em sistemas de produção agrícola. Com o objetivo de avaliar a atividade de proteases e suas relações com os teores de diferentes formas de N em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranjeira, foram coletadas amostras de solo em duas profundidades (0-10 e 10-20 cm), na linha de projeção da copa e nas entrelinhas, nos meses de novembro e dezembro/98, fevereiro e março/99. Em março/99, época recomendada para a diagnose foliar, também foram coletadas amostras de folhas. As amostras de solo foram avaliadas com relação à atividade de proteases e aos teores de N-amoniaco, N-nitrato, N-total, N-amoniaco obtido após incubação anaeróbia (N-pot) e N-amoniaco extraído por solução de CaCl₂ sob autoclavagem (N-autoclave). Nas amostras de folha, determinou-se o teor de N-total. A atividade de proteases foi influenciada pelo local e pela profundidade de amostragem, tendo sido mais elevada na linha de projeção da copa e profundidade de 0-10 cm. A aplicação de fertilizante orgânico causou aumento na atividade de proteases, principalmente na camada de 0-10 cm. O coeficiente de correlação entre atividade de proteases e outros métodos para avaliação da disponibilidade de N dependeu da época, do local e da profundidade de amostragem. A correlação entre o N-foliar, obtido na época indicada para diagnose foliar, a atividade de proteases e as demais formas para avaliar disponibilidade de N (N-amoniaco, N-nitrato, N-autoclave e N-pot) variou com a época de amostragem. A atividade de proteases foi positiva e altamente correlacionada com o N-foliar, obtido na época indicada para fins de diagnose foliar, para amostras de terra retiradas nas entrelinhas (0-10 cm), no mês de dezembro/1998.

Termos de indexação: enzima, citros, diagnose foliar, nutrição de plantas.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor apresentada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP. Recebido para publicação em fevereiro de 2000 e aprovado em agosto de 2004.

⁽²⁾ Pós-Graduanda da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP. Rodovia Carlos Tonani, Km 5, CEP 14870-000 Jaboticabal (SP). E-mail: ericatome@bol.com.br

⁽³⁾ Professor Titular em Bioquímica do Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP. E-mail: wjmelo@fcav.unesp.br

SUMMARY: *PROTEASE ACTIVITY AND NITROGEN AVAILABILITY IN A LATOSOL UNDER ORANGE CROP*

The knowledge of the dynamics of the organic N compound mineralization in the soil is important for the efficient use of N in agricultural production systems. With the objective of evaluating the protease activity and its relations to the contents of different N forms in a Dark Red Latosol cultivated with orange trees, soil samples were collected from two depths (0–10 and 10–20 cm) under top projection and between rows in the months of November and December 1998 and February and March 1999. Leaves were also sampled in March 1999, the recommended time for leaf diagnosis. Soil samples were evaluated for protease activity, ammonium-N, nitrate-N, total-N, ammonium-N obtained after anaerobic incubation, and ammonium-N extracted by CaCl₂ under autoclaving. Organic fertilization increased protease activity mainly in the layer 0–10 cm. The correlation coefficient between the protease activity and the other methods for estimating N availability depended on the sampling time, place and depth. The correlation between leaf-N determined at the time indicated for leaf diagnosis and the other methods for estimating N availability altered according to the sampling time. Protease activity was positive and closely related to leaf-N, determined at the time indicated for leaf diagnosis, when soil samples were collected between rows (0–10 cm) in December 1998.

Indexation terms: soil enzyme, citrus, leaf diagnosis, availability, plant nutrition.

INTRODUÇÃO

A fertilização nitrogenada é uma prática que ainda precisa ser aperfeiçoada, tendo em vista a complexidade e a velocidade das transformações do elemento no solo. O ideal seria aplicar uma dose de N o mais próximo possível da demanda da planta e que a disponibilidade do nutriente estivesse sincronizada à demanda das plantas, de modo a evitar a poluição das águas superficiais e subterrâneas (NO₃⁻) ou da atmosfera (N₂O), um dos principais agentes do efeito estufa. Para isso, é necessário o conhecimento da dinâmica do N no solo e de métodos analíticos que determinem, de modo prático e econômico, com a devida antecedência, quanto de N seria necessário aplicar ao solo e em que momento isto deveria ser praticado.

Atualmente, no estado de São Paulo, usa-se o teor de N-foliar para recomendação da fertilização nitrogenada (Quaggio et al., 1996).

Os métodos químicos para avaliação da disponibilidade de N no solo são úteis, simples e rápidos. Complementarmente, segundo Keeney & Bremner (1966), os métodos biológicos podem ser usados para avaliar a consistência dos métodos químicos.

Sabe-se que a maior parte do N no solo encontra-se em formas orgânicas, pouco disponíveis para as plantas, e que o primeiro passo na mineralização do N-protéico no solo envolve sua hidrólise, catalisada por enzimas denominadas proteases. A ação dessas enzimas dá origem a uma mistura de aminoácidos

(Burns, 1982). Os aminoácidos oriundos da hidrólise das proteínas são, em seguida, desaminados, com a produção de NH₄⁺, que é passível de absorção ou nitrificação.

Diversos autores têm encontrado correlações entre a atividade de proteases no solo e os teores de N-mineral (Suttner & Alef, 1988; Tate et al., 1991; Badalucco et al., 1997). Essas correlações devem ser interpretadas com cautela, pois podem variar com as condições de clima, solo e cultura (Ross & McNeilly, 1975; Haynes & Swift, 1988).

Assim, considerando as relações já conhecidas entre a atividade de proteases no solo e a mineralização do N-orgânico, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de proteases em um Latossolo Vermelho distrófico, cultivado com laranjeira, correlacionando-a com os diferentes métodos atualmente conhecidos para avaliar a disponibilidade de N e planejar a fertilização nitrogenada.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Piratininga, localizada no município de Monte Azul Paulista (SP) (48 ° 39 ' W e 20 ° 54 ' S), cujo clima é do tipo Cwa, segundo Köppen, ou seja, inverno seco e precipitação anual de 1.000 a 1.400 mm. A área vem sendo cultivada com *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, variedade Hamlim, há 12 anos. Anualmente, são efetuadas fertilizações orgânicas, constituídas por

80 % de pelete de polpa cítrica (CPP) e 20 % de esterco de galinha, e foliares, com sulfato de zinco e ácido bórico. O adubo orgânico é incorporado superficialmente (0–10 cm) na linha de projeção da copa, sendo parcelado em três vezes (setembro, novembro e dezembro). Na época das chuvas, realiza-se o cultivo de soja (*Glicine max* (L.) Merrill) em entrelinhas alternadas (linha sim, outra não, com alternância de ano para ano). Os restos culturais da soja são incorporados com grade após a colheita.

O Latossolo Vermelho distrófico apresentava os seguintes atributos químicos (camada de 0–20 cm) em setembro/98, antes do início do experimento: pH (CaCl_2) 5,2, 18 g dm^{-3} de matéria orgânica, 87 mg dm^{-3} de P (resina), $2,1 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de K, $29 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de Ca, $9 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de Mg, $22 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de H + Al e 65 % de saturação por bases.

Os tratamentos avaliados foram: local de amostragem (linha de projeção da copa e entrelinhas), profundidade de amostragem (0–10 e 10–20 cm) e época de amostragem (novembro e dezembro/98, fevereiro e março/99). Os atributos analisados foram: N-amoniacoal, N-nitrato, N-total, N-amoniacoal extraído por solução de CaCl_2 ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$) sob autoclavagem (N-autoclave), N-amoniacoal extraído após incubação anaeróbia (N-pot) e atividade de proteases. Também se avaliou o teor de N-total em amostras foliares.

Cada parcela foi constituída por seis plantas vizinhas, com 12 anos de idade, localizadas na mesma linha. Em cada parcela, foram coletadas quatro amostras compostas de solo (0–10 e 10–20 cm na linha de projeção da copa e nas entrelinhas), cada uma formada por seis amostras simples, uma em cada planta da parcela.

Na época indicada para diagnose foliar (março/99), coletaram-se a 3ª e a 4ª folha, a partir da ponta de ramos que continham frutos com diâmetro médio de 12 cm, geradas na primavera e com seis meses de idade (Malavolta et al., 1989). Foram colhidas oito folhas por planta, localizadas na altura média e dispostas segundo os pontos cardeais. As folhas assim obtidas foram lavadas com solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, água, água destilada e água deionizada. Após a lavagem, foram secas em estufa com circulação forçada de ar ($60\text{--}70 \text{ }^\circ\text{C}$), moídas em moinho tipo Willey com peneira de 40 mesh e acondicionadas em sacos de papel.

O N-foliar foi determinado pelo método microKjeldahl (Sarruge & Haag, 1974).

A atividade de proteases foi determinada pelo método proposto por Alef & Nannipieri (1995), que consiste na incubação da amostra de solo com solução de caseína (substrato) por 2 h em pH 8,1 e a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo-se a determinação da quantidade de tirosina liberada por meio da reação com o reagente Folin-Ciocateau (formação de um complexo de cor

azul, cuja absorbância foi lida em comprimento de onda de 700 nm). A atividade de proteases foi expressa em $\text{mg tirosina g}^{-1} \text{ terra h}^{-1}$ (base seca).

O teor de N-total nas amostras de terra foi determinado conforme o método descrito em Melo (1974), que consiste em oxidar o N-orgânico a N-amoniacoal pelo ácido sulfúrico em presença de catalisadores e elevadores de temperatura. O N-amoniacoal produzido foi determinado por destilação a vapor.

As formas nitrogenadas de N-amoniacoal e N-nitrato foram determinadas conforme Bremner & Keeney (1965), cujo método consiste em extrair o N-amoniacoal e o N-nitrato com solução de KCl 2 mol L^{-1} . O N-amoniacoal extraído foi determinado por destilação a vapor, após alcalinização do meio com MgO. Após a destilação da amônia, o extrato foi tratado com uma liga, segundo Devarda, que reduziu o íon nitrato a amônia, que foi então determinada por nova destilação a vapor.

O teor de N-pot foi determinado segundo Keeney (1982), método biológico, que consiste em incubar a amostra de solo em condições anaeróbias por um período de sete dias, avaliando-se, então, o N-amoniacoal produzido.

O N-autoclave foi determinado pelo método descrito por Keeney (1982), o qual utiliza solução de CaCl_2 sob autoclavagem por 16 h a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ como agente de hidrólise do N-orgânico. O N-amoniacoal extraído foi determinado por destilação a vapor.

Os resultados das quatro épocas de amostragem foram submetidos à análise de variância pelo Teste F. O Teste de Tukey foi usado para comparação das médias nos casos em que o teste F foi significativo. Também foram calculados os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de proteases foi mais elevada em amostras de terra obtidas na linha de projeção da copa das plantas de laranja e na camada de 0–10 cm (Figura 1), o que também foi observado por Pansombat et al. (1997). Segundo Badalucco et al. (1997), teores mais elevados de matéria orgânica e os exsudatos radiculares podem favorecer a atividade microbiana e, conseqüentemente, aumentar a atividade de proteases nesta região. Nas amostragens realizadas em novembro/98, ou seja, logo após a adubação orgânica, a atividade foi mais elevada, o que também pode ser explicado por maior atividade microbiana. Kandeler et al. (1999) também observaram aumento da atividade de proteases após adição de compostos orgânicos ao solo.

A concentração de N-total nas amostras de solo tendeu a diminuir do início para o final do

experimento, o que pode ser atribuído a um intenso processo de mineralização (Figura 2). Em novembro/98, não se detectou efeito de tratamento, tendo sido, nas demais épocas, o teor mais baixo observado na profundidade de 10–20 cm e entrelinhas. De modo geral, o teor mais elevado de N-total ocorreu na profundidade de 0–10 cm e linha de projeção da copa, exceto na amostragem realizada em março/99. Todavia, nem sempre, as diferenças foram significativas, o que se explica pelo tipo de manejo adotado.

Não se detectou efeito de tratamento sobre o teor de N-amoniaco, o que pode ser atribuído à elevada variabilidade nos resultados obtidos (resultados não apresentados).

A concentração de N-nitrato variou com a época de amostragem, apresentando valores mais elevados em fevereiro e março/99 e valores mais baixos em

dezembro/98. Em fevereiro/99, detectou-se efeito de tratamentos, sendo os valores mais altos obtidos na profundidade de 0–10 cm e projeção de copa, e os mais baixos, na profundidade de 10–20 cm e entrelinhas (Figura 3). Isso deve estar relacionado com a boa precipitação atmosférica no mês de fevereiro (102,3 mm), associada à temperatura (média de 26 °C) e à adubação orgânica na linha de projeção da copa das plantas. Em Latossolo Vermelho eutrófico cultivado com milho, Melo et al. (1975) constataram que o teor de N-amoniaco diminuiu de dezembro a março, enquanto o teor de N-nitrato diminuiu do início ao final de dezembro, para depois aumentar, sempre na forma de variações bruscas em intervalos de amostragem de 15 dias. Suhet et al. (1985) também observaram picos de N-nitrato em Latossolo Vermelho distrófico de cerrado no período das chuvas.

Amostras de solo na profundidade de 0–10 cm e linha de projeção da copa apresentaram os maiores teores de N-autoclave, diferindo dos demais tratamentos (exceto em fevereiro/99 para amostras obtidas na profundidade de 10–20 cm e linha de projeção da copa). Os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 4). Segundo Sanches et al. (1999), as maiores alterações químicas em solo cultivado com laranjeira ocorreram na região da linha de projeção da copa, local onde foram realizadas as adubações. Por outro lado, o uso da grade, que acelera a decomposição da matéria orgânica e aumenta os processos de lixiviação e de erosão, pode ter contribuído para acentuar as diferenças entre as camadas do solo.

Exceto para as amostras de março/99, que não apresentaram diferenças entre tratamentos, o teor de N-pot foi maior nas amostras obtidas na profundidade de 0–10 cm e linha de projeção da copa,

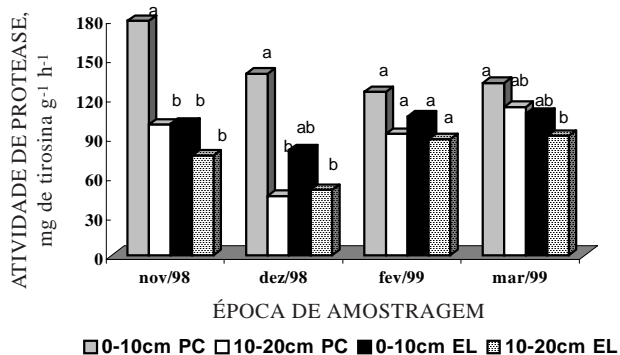


Figura 1. Atividade de proteases em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranjeira em diferentes épocas, locais e profundidades de amostragem (PC = linha de projeção da copa, EL = entrelinhas). Letras comparam atividades dentro de cada época de amostragem a 5 % pelo teste de Tukey.

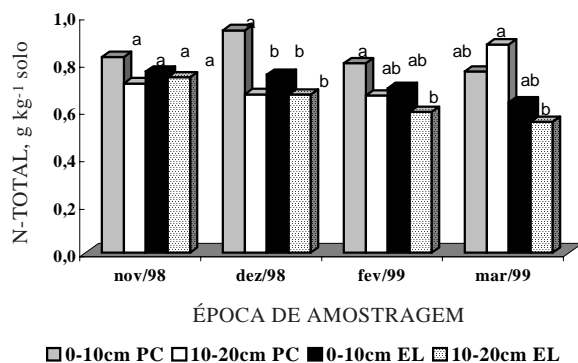


Figura 2. N-total em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranjeira em diferentes épocas, locais e profundidades de amostragem (PC = linha de projeção da copa, EL = entrelinhas). Letras comparam atividades dentro de cada época de amostragem a 5 % pelo teste de Tukey.

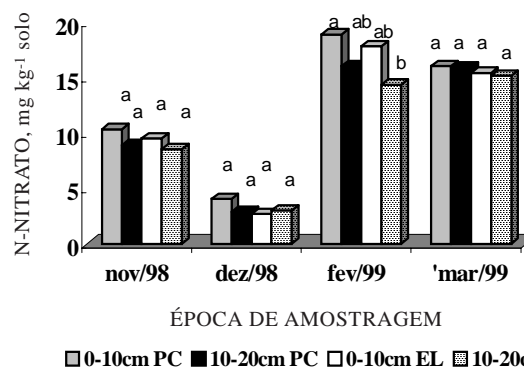


Figura 3. N-nitrato em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranjeira em diferentes épocas, locais e profundidades de amostragem (PC = linha de projeção da copa, EL = entrelinhas). Letras comparam atividades dentro de cada época de amostragem a 5 % pelo teste de Tukey.

porém não diferiu dos demais tratamentos, exceto para a profundidade de 10–20 cm e entrelinhas onde o teor de N-pot foi menor (Figura 5). Os valores mais baixos para N-pot foram obtidos na amostragem de fevereiro/99.

Tanto para a atividade de proteases quanto para os demais métodos utilizados na avaliação da disponibilidade do N, observou-se tendência para valores maiores na camada de 0–10 cm, concordando com as observações realizadas por outros pesquisadores (Ambroz, 1970; Alef et al., 1988; Bohm & Ahrens, 1990; Tate et al., 1991).

A correlação entre a atividade de proteases e outros métodos para avaliação da disponibilidade de N

(Quadro 1) resultou em valores significativos, dependendo do método, da época, do local e da profundidade de amostragem. Para amostras obtidas em novembro/98, encontrou-se correlação positiva entre a atividade de proteases e o N-nitrato ($r = 0,92^{**}$) e negativa com o N-total ($r = -0,87^*$), para as amostras obtidas na projeção de copa (0–10 cm), e correlação positiva com o N-pot ($r = -0,83^*$), para amostras obtidas nas entrelinhas (10–20 cm). Em dezembro/98, foram obtidas correlações positivas entre a atividade de proteases, N-pot e o N-autoclave em amostras obtidas na linha de projeção da copa (0–10 cm) ($r = 0,89^*$ e $0,96^{**}$, respectivamente), e N-amoniacal ($r = 0,93^{**}$) nas entrelinhas (0–10 cm). Na amostragem de fevereiro/99, correlação positiva foi obtida para N-pot em amostras obtidas na entrelinha e 0–10 cm ($r = 0,85^*$). Finalmente, na amostragem de março/99, época indicada para fins de diagnose foliar, correlações significativas foram obtidas para N-pot ($r = 0,94^{**}$), para amostras obtidas na linha de projeção da copa de 0–10 cm e para N-total ($r = 0,85^*$), para amostras obtidas nas entrelinhas de 10–20 cm.

Os melhores coeficientes de correlação entre a atividade de proteases e os teores de N-pot e N-autoclave foram obtidos para as amostras coletadas na linha de projeção da copa (0–10 cm), em dezembro/98 e março/99 (Quadro 1). Constatou-se estreita relação entre a atividade de proteases e o N-pot, o que pode ser atribuído à participação destas no primeiro passo do processo de mineralização do N-protéico. Desta forma, a maior frequência de correlações significativas e positivas foi obtida para o N-pot em amostras obtidas na linha de projeção da copa (0–10 cm).

Vários autores têm encontrado correlações entre a atividade de proteases e o teor de N-pot (Yamada & Okino, 1989; Bohm & Ahrens, 1990; Bonmati et al., 1991; Shindo, 1995; Pansombat et al., 1997; Silva et al., 1998). A variabilidade dos resultados, considerando o local, profundidade e época de amostragem, é devida às condições climáticas, edáficas e culturais (Ross & Macneilly, 1975; Hadas et al., 1996; Badalucco et al., 1997).

Considerando que a avaliação da atividade de proteases é muito mais rápida que a avaliação de N-pot (1 h e sete dias, respectivamente), a substituição do N-pot pela atividade de proteases seria interessante. Todavia, há necessidade de mais estudos a fim de calibrar esta avaliação como método para estimar a disponibilidade de N para plantas de laranjeira.

Os coeficientes de correlação entre a atividade de proteases, os teores de N no solo das amostras de março/99 (época da diagnose foliar) e as demais épocas de amostragem foram baixos (Quadro 2). Isso se deve à alta variância não explicada dos dados, ocasionada pela ampla variação entre épocas, locais e profundidades de amostragem.

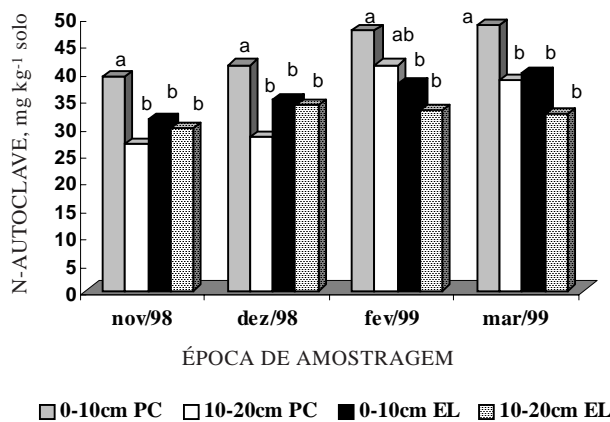


Figura 4. N-amoniaco extraído por solução de CaCl_2 ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$) sob autoclavagem em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranjeira em diferentes épocas, locais e profundidades de amostragem (PC = linha de projeção da copa, EL = entrelinhas). Letras comparam atividades dentro de cada época de amostragem a 5 % pelo teste de Tukey.

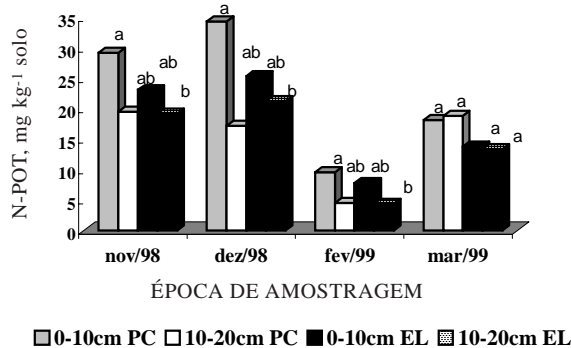


Figura 5. N-mineralizável em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranjeira em diferentes épocas, locais e profundidades de amostragem (PC = linha de projeção da copa, EL = entrelinhas). Letras comparam atividades dentro de cada época de amostragem a 5 % pelo teste de Tukey.

Quadro 1. Correlações entre atividade de proteases e teores de diferentes formas de N em amostras de solo obtidas em diferentes locais (linha de projeção da copa e entrelinhas), em duas profundidades (0-10 e 10-20 cm) e quatro épocas de amostragem em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranja

Posição de amostragem	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	r		
			N-total	N-pot	N-autoclave
			Novembro/98		
0-10 PC ⁽¹⁾	-0,38	0,92**	-0,87*	0,18	0,29
10-20 PC	0,11	0,34	-0,14	-0,40	-0,25
0-10 EL	-0,32	-0,64	0,19	0,72	0,33
10-20 EL	0,29	-0,47	0,44	0,83*	0,09
			Dezembro/98		
0-10 PC	0,19	0,30	0,55	0,89*	0,96**
10-20 PC	0,25	-0,37	-0,19	0,30	-0,31
0-10 EL	0,93**	0,10	-0,24	-0,40	-0,76
10-20 EL	0,17	-0,12	-0,04	-0,07	0,52
			Fevereiro/99		
0-10 PC	-0,40	-0,50	0,21	0,38	0,12
10-20 PC	-0,46	0,80	0,71	0,70	-0,83*
0-10 EL	-0,39	0,49	0,09	0,85*	-0,78
10-20 EL	0,18	0,61	0,26	0,49	-0,04
			Março/99		
0-10 PC	0,39	0,47	-0,51	0,94**	0,73
10-20 PC	0,67	0,25	-0,08	0,68	0,30
0-10 EL	0,12	0,53	-0,41	0,27	0,13
10-20 EL	0,01	0,03	0,85*	0,01	0,52

* P < 0,05 e ** P < 0,01.

⁽¹⁾ PC = linha de projeção da copa. EL = entrelinhas. N-autoclave = N-amoniaco obtido por extração com solução de CaCl₂ sob autoclavagem. N-pot = N-amoniaco obtido por incubação anaeróbia.

Quadro 2. Coeficientes de correlação entre atividade de proteases, N-amoniaco, N-nitrato, N-total, N-pot, N-autoclave em amostras de solo obtidas em março/99 (época indicada para diagnose foliar) e as demais épocas de amostragem em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranja

Forma de N	Protease	N-amoniaco	N-Nitrato	r		
				N-total	N-pot	N-autoclave
				Novembro/98		
N-amoniaco	0,34	-	0,14	-0,07	0,02	0,41*
N-nitrato	0,27	0,39	-	-0,07	-0,06	0,46*
N-total	-0,09	-0,24	-0,11	-	-0,18	-0,09
N-pot	0,13	-0,06	-0,31	0,05	-	0,50*
N-autoclave	0,12	0,06	-0,09	0,00	0,00	-
				Dezembro/98		
N-amoniaco	0,22	-	0,25	0,15	0,27	0,31
N-nitrato	0,48*	0,20	-	-0,21	0,42*	0,37
N-total	0,28	0,26	0,15	-	0,07	0,47*
N-pot	0,08	0,22	0,22	-0,14	-	0,48*
N-autoclave	0,06	0,21	0,48*	-0,16	-0,06	-
				Fevereiro/99		
N-amoniaco	0,14	-	0,31	0,09	0,08	0,03
N-nitrato	0,20	0,07	-	0,11	0,06	0,37
N-total	-0,01	0,04	-0,10	-	-0,06	0,38
N-pot	0,15	-0,01	-0,18	-0,03	-	0,31
N-autoclave	0,59**	0,48*	0,17	0,22	0,34	-

* P < 0,05 e ** P < 0,01

⁽¹⁾ N-autoclave = N-amoniaco obtido por extração com solução de CaCl₂ sob autoclavagem. N-pot = N-amoniaco obtido por incubação anaeróbia.

Os coeficientes de correlação entre a atividade de proteases, os teores de N no solo obtidos por diferentes métodos e o teor de N-foliar, em novembro/98, foram significativos e positivos para o N-amoniaco em amostras coletadas nas entrelinhas (0–10 cm) ($r = 0,88^*$) e negativos para o N-total em amostras obtidas nas entrelinhas (10–20 cm) ($r = -0,89^*$). Em dezembro/98, os coeficientes de correlação foram significativos e positivos para a atividade de proteases e o N-foliar em amostras obtidas na projeção da copa e nas entrelinhas (ambas a 0–10 cm) ($r = 0,66^*$ e $r = 0,90^*$, respectivamente), para o N-amoniaco em amostras obtidas na linha de projeção da copa e nas entrelinhas (ambos a 0–10 cm) ($r = 0,74^*$ e $r = 0,97^{**}$, respectivamente) e para o N-total em amostras obtidas na linha de projeção da copa (0–10 cm) ($r = 0,74^*$) (Quadro 3).

Em fevereiro/99, os coeficientes foram significativos e positivos para o N-amoniaco em amostras obtidas nas entrelinhas (0–10 cm) e para o N-nitrato em amostras obtidas na linha de projeção da copa (0–10 cm) ($r = 0,87^*$ e $r = 0,81^*$, respectivamente), enquanto coeficiente significativo e negativo foi obtido para atividade de proteases ($r = -0,90^*$) (Quadro 3).

Finalmente, na amostragem realizada em março/99, coeficientes de correlação significativos e positivos foram obtidos para o N-autoclave em

amostras obtidas na linha de projeção da copa (10–20 cm), e para o N-autoclave em amostras obtidas na linha de projeção da copa (10–20 cm) e entrelinhas (0–10 cm) ($r = 0,87^*$, $r = 0,76^*$ e $r = 0,60^*$, respectivamente).

Correlações significativas entre o N-foliar e o N-autoclave também foram observadas por Campbell et al. (1993) e Gianello et al. (2000).

Correlações significativas entre N foliar, obtido no momento da diagnose foliar, atividade de proteases e outros métodos de avaliação de disponibilidade de N ocorreram, com maior frequência, em amostras obtidas na profundidade de 0–10 cm, o que se atribui à maior atividade dos microrganismos decorrente do maior aporte de material orgânico.

Como o que se busca é um método que permita estimar a disponibilidade de N para a laranja em avaliação que anteceda a aplicação do fertilizante nitrogenado, 40 % em setembro-outubro, 30 % em dezembro-janeiro e 30 % em março-abril, segundo Malavolta et al. (1994), pode-se concluir que o N-amoniaco e a atividade de proteases em virtude das correlações obtidas com o N-foliar (Quadro 3), seriam métodos que, devidamente calibrados, poderiam atingir aquele escopo.

O N-autoclave e o N-pot, por terem apresentado correlações com o N-foliar em amostras obtidas no

Quadro 3. Coeficientes de correlação entre o teor de N-foliar (março/99), atividade de proteases e teores das diferentes formas de N em amostras de solo obtidas em diferentes locais (linha de projeção da copa e entrelinhas), duas profundidades (0–10 e 10–20 cm) e quatro épocas de amostragem em Latossolo Vermelho distrófico cultivado com laranja

Local de amostragem	N-foliar			
	Novembro/98	Dezembro/98	Fevereiro/99	Março/99
			Protease	
0–10 cm PC ⁽¹⁾	-	0,66*	-0,90*	-
0–10 cm EL	-	0,90*	-	-
			N-amoniaco	
0–10 cm PC	-	0,74*	-	-
0–10 cm EL	0,88*	0,97**	0,87*	-
			N-nitrato	
0–10 cm PC	-	-	0,81*	-
			N-total	
0–10 cm PC	-	0,74*	-	-
10–20 cm EL	-0,89*	-	-	-
			N-pot	
10–20 cm PC	-	-	-	0,87*
			N-auto	
10–20 cm PC	-	-	-	0,76*
0–10 cm EL	-	-	-	0,60*

* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$

⁽¹⁾ PC = linha de projeção da copa. EL = entrelinhas. N-autoclave = N-amoniaco obtido por extração com solução de CaCl_2 sob autoclavagem. N-pot = N-amoniaco obtido por incubação anaeróbia.

momento da diagnose foliar, quando já seria tarde a aplicação do fertilizante nitrogenado para a produção do ano, talvez possam ser de utilidade na programação da fertilização para o ano agrícola seguinte. Há que considerar, contudo, que são métodos demorados.

CONCLUSÕES

1. A atividade de proteases variou com o local e com a profundidade de amostragem, tendo sido mais alta na linha de projeção da copa e profundidade de 0–10 cm.

2. A aplicação de fertilizante orgânico causou aumento na atividade de proteases, principalmente na camada de 0–10 cm.

3. O grau de correlação entre a atividade de proteases e os outros métodos para avaliação da disponibilidade de N dependeu da época, do local e da profundidade de amostragem.

4. As correlações entre a atividade de proteases, as várias formas de N do solo (N-amoniaco, N-nitrato, N-autoclave e N-pot) e o N-foliar no momento da diagnose variaram com a época de amostragem.

5. A atividade de proteases poderá vir a ser um método para programação da fertilização nitrogenada para a cultura do citros, uma vez que se correlaciona com o N-foliar usado para fins de diagnose.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro; ao citricultor, Eng^o-Agr^o Wanderley Zucchi Rodas, em cuja propriedade a pesquisa foi desenvolvida; à CAPES, pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor, e à Eng^a-Agr^a. Andréa Cristiane Sanches, pela colaboração nos trabalhos de campo.

LITERATURA CITADA

ALEF, K. & NANNIPIERI, P. Protease activities. In: ALEF, K. & NANNIPIERI, P., eds. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. New York, Academic Press, 1995. p.313-315.

ALEF, K.; BECK, T.; ZELLES, L. & KLEINER, D. A comparison of methods to estimate microbial biomass and N-mineralization in agricultural and grassland soils. *Soil Biol. Biochem.*, 20:561-565, 1988.

AMBROZ, Z. Factors influencing distribution of some proteolytic enzyme in soils. *Zentr. fur Bakt.*,125:433-437, 1970.

BADALUCCO, L.; KUIKMAN, P.J. & NANNIPIERI, P. Protease and deaminase activities in wheat rhizosphere and their relation to bacterial and protozoan populations. *Biol. Fert. Soils*, 23:99-104, 1997.

BOHM, H. & AHRENS, E. The influence of different tillage method on nitrogen mineralization and protease activity – long term experiments at 5 sites. *Verb. Deut. Landwirt. Unters. und Forschung*, 32:683-688, 1990.

BONMATI, M.; CECCANTI, B. & NANNIPIERI, P. Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23:391-396, 1991.

BREMNER, J.M. & KEENEY, D.R. Steam-distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. In: BLACK, C.A., ed. *Methods of Soil Analyses: part 2*. Madison, American Society of Agronomy, 1572p. 1965.

BURNS, R.G. Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.*, 14:423-427, 1982.

CAMPBELL, C.A.; ELLERT, B.H. & JAME, Y.W. Nitrogen mineralization potential in soils. In: CARTER, M.R., ed. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publisher, 1993. p.341-349.

GIANELLO, C.; CAMARGO, F.A.O.; REICHMANN, E. & TEDESCO, M.J. Avaliação da disponibilidade do N do solo estimada por métodos químicos. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:93-101, 2000.

HADAS, A.; KAUTSKY, L. & PORTNOY, R. Mineralization of composted manure and microbial biomass dynamics in soil as affected by long-term nitrogen management. *Soil Biol. Biochem.*, 28:733-738, 1996.

HAYNES, R.J. & SWIFT, R.S. Effects of lime and phosphate additions on changes in enzyme activities, microbial biomass and levels of extractable nitrogen, sulphur and phosphorus in an acid soil. *Biol. Fert. Soils*, 6:153-158, 1988.

KANDELER, E.; PALLI, S.; STEMMER, M. & GERZABEK, M.H. Tillage changes, microbial biomass and enzyme activities in particle-size fractions of a Haplic Chernozem. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1253-1264, 1999.

KEENEY, D.R. Availability index. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H. & KEENEY, D.R., eds. *Methods of soil analysis*. American Society of Agronomy, 1982, p.711-733.

KEENEY, D.R. & BREMNER, J.M. A chemical index of soil nitrogen availability. *Nature*, 211:892-893, 1966.

MALAVOLTA, E.; PRATES, H.S.; CASALE, H. & LEÃO, H.C. Seja o doutor de seus citros. *Info. Agron.*, 65:1-22, 1994.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.

- MELO, W.J. Variação do N-amoniaco e N-nítrico em um Latossolo Roxo cultivado com milho (*Zea mays* L.) e com lablab (*Dolichos lablab* L.). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 1974, 104p. (Tese de Doutorado)
- MELO, W.J.; CARDOSO, E.J.B.N. & SUZUKI, J. Variação do N-nítrico e N-amoniaco em um Latossolo Roxo cultivado com *Zea mays*, L. (milho). Científica, 3:263-276, 1975.
- PANSOMBAT, K.; KANAZAWA, S. & HORIGUCHI, T. Microbial ecology in tea soils. Soil Sci. Plant. Nutr., 43:431-438, 1997.
- QUAGGIO, J.A.; RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; RODRIGUES, O.; BATAGLIA, O.C.; SANCHES, A.C.; BLASCO, E.E.A.; NEGRI, J.D.; MALAVOLTA, E. & VITTI, G.C. Citros: laranja, limão, tangerina, murcota. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. & FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. 2.ed. Campinas, Instituto Agrônomo e Fundação, IAC. 1996. 285p. (Boletim Técnico, 100)
- ROSS, D.J. & MACNEILLY, B.A. Studies on a climosequence of soils in Tussock grassland. 3. Nitrogen mineralization and protease activity. N. Zealand. J. Sci., 3:134-147, 1975.
- SANCHES, A.C; SILVA, A.P.; TORMENA, C.A. & TRIGOLIN, A.T. Impacto do cultivo de citros em propriedades químicas, densidade do solo e atividade microbiana de um Podzólico Vermelho-Amarelo. R. Bras. Ci. Solo, 23:91-99, 1999.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 1974. 56p.
- SHINDO, H. Effect of continuous compost application on the activities of protease, beta-acetylglucosaminidase, and adenosine deaminase in soils of upland fields and relationship between the enzyme activities and the mineralization of organic nitrogen. Jap. J. Soil Sci. Plant. Nutr., 63:190-195, 1995.
- SHUET, A.R.; PERES, J.R.R. & VARGAS, M.A.T.N. In: Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo. GOEDERT, W.J., ed. São Paulo, Nobel, 1985. p.167-202.
- SILVA, E.T.; MELO, W.J. & TEIXEIRA, S.T. Soil protease activity and nitrogen availability to sorghum. In: CONGRES MONDIAL DE SCIENCE DU SOL, 16., Montpellier - França, 1998. Summaries. Montpellier, 1998, p.1-234.
- SUTTNER, T. & ALEF, K. Correlation between the arginine ammonification, enzyme activities, microbial biomass, physical and chemical properties of different soils. Zentra. Mikrob., 143:569-573, 1988.
- TATE, R.L.III; PARMELEE, R.W.; EHRENFELD, J.G. & O'REILLY, L. Nitrogen mineralization: root and microbial interaction in pitch pine microcosms. Soil Sci. Soc. Am. J., 55:1004-1008, 1991.
- YAMADA, R. & OKINO, H. Soil enzyme activities in three kinds of soils with successive application of organic matter. Relationship between soil enzyme activities (cellulase, beta-glucosidase, protease and phosphatase) and natural substrate content. Res. Bul. Aichi Ken Agri. Res. Center, 21:273-280, 1989.

