



Physiological characteristics of cloned cacao trees treated with nitrogen fertilization¹

Características fisiológicas de cacauzeiros clonados submetidos a fontes de adubação nitrogenada

Kalline Mendes Ferreira², Vanuza de Souza³, Juliana Leite da Silva², Daniel Nunes Sodr  Rocha², Alessandro Carlos Mesquita^{2*}

Abstract: Cacao is native to the Amazon rainforest and has adapted well to the climate and soils of southern Bahia. The potential expansion of cacao farming to non-traditional areas could generate foreign exchange for the country by reducing imports or even allowing the country to return to the role of cocoa bean exporter. It is known that nitrogen fertilization is essential for cacao cultivation, due to its high demand for this nutrient. Accordingly, the influence of fertilization of two nitrogen sources (urea and calcium nitrate), on total soluble protein (PTN), total soluble sugars (AST), reducing sugars (RA), sucrose, Nitrate Reductase enzyme (NR) activity and chlorophyll indexes of cloned cacao in the Lower São Francisco Valley were investigated. The experimental format was a randomized complete block design, in a 5 x 2 factorial scheme, the first factor being five cacao clones (PH-16, CCN-51, PS-1319, CCN-10 and TSH-1188), and the second factor, two sources of nitrogen (calcium nitrate and urea), with three replicates. The different nitrogen sources presented different behavior in relation to the physiological characteristics of the clones evaluated. Regardless of the nitrogen source, the nitrate reductase enzyme showed greater levels of translation activity in cacao leaf than in root tissue.

Key words: Carbohydrate. Nitrogen. Nitrate reductase. *Theobroma cacao* L.

Resumo: O cacauzeiro   originário da floresta amazônica e adaptou-se perfeitamente ao clima e aos solos do Sul da Bahia. A possibilidade de expansão da cacauicultura para áreas não tradicionais pode gerar divisas para o país pela diminui o da importa o ou, até mesmo, possibilitar que o Brasil retorne ao papel de exportador de amêndoas de cacau. Em razão da sua elevada demanda, a adub o nitrogenada   fundamental no seu cultivo. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar a influência da adub o com duas fontes de nitrogênio (ureia e nitrato de cálcio), nos teores de proteínas solúveis totais (PTN), a c ares solúveis totais (AST), a c ares redutores (AR), sacarose, na enzima Redutase do Nitrato (RN) e nos índices de clorofila, de cacauzeiros clonados, no Vale do Submédio São Francisco. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial (5 x 2), sendo o primeiro fator, cinco clones de cacauzeiros (PH-16, CCN-51, PS-1319, CCN-10 e TSH-1188), e o segundo fator, duas fontes de nitrogênio (nitrato de cálcio e ureia), com três repeti es. As diferentes fontes nitrogenadas apresentaram comportamento diferenciado com rela o às características fisiológicas nos clones avaliados. Independentemente da fonte nitrogenada, a enzima redutase do nitrato atua com maior eficácia no tecido foliar do que no tecido radicular do cacauzeiro.

Palavras-chave: Carboidratos. Nitrogênio. Redutase do nitrato. *Theobroma cacao* L.

*Corresponding author

Submitted for publication on 08/02/2019 and approved 15/05/2019

¹Paper extracted from a research project of the Bahia State University, funded by the Foundation for Research Support of the State of Bahia

²Bahia State University, Department of Technology and Social Sciences, Juazeiro, Bahia, Brazil; kmf.agronomia@gmail.com; juliana1697@outlook.com; danielnunesif@gmail.com; alessandro.mesq@yahoo.com.br

³Federal University of the São Francisco Valley - Campus Agricultural Sciences, Highway BR 407, 12 Lt 543, 56300-000, Petrolina, Pernambuco, Brazil; van.nuzasouza@hotmail.com

INTRODUCTION

Cacao (*Theobroma cacao* L.), a member of the family Sterculiaceae, is a perennial and economically important plant, mainly as raw material for the manufacture of chocolate (SCHMILDT *et al.*, 2017).

In the 1980s, Brazil ranked second in the world for cocoa production, a position lost in the 90's, mainly due to the appearance of witches-broom, a disease caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa*, in the main producing region of the country, the south of Bahia state (ZUGAIB, BARRETO, 2015). As a result of this, Brazil went from a prime cocoa exporting country to importer. In 2017, more than 61,000 tonnes of cocoa were imported from Ghana (AIPC, 2018). In 2018, the Brazilian harvest closed around 255,184 tons of almonds, with the state of Bahia being one of the largest producers, with 122,568 tons (IBGE, 2018).

The expansion of cacao plantations into non-traditional areas has the potential to generate foreign exchange for the country, by reducing imports, and even allowing the country to return to the role of a cocoa exporter. Cacao can be grown in semiarid regions where rainfall of 600 mm per year is concentrated in the months of December to March, relative air humidity is around 40 to 50%, luminosity is high and soils are fertile (SEIXAS, 2004). Such conditions, when linked with irrigation, temporary shading with banana, papaya or cassava for up to two years to avoid damage during initial tree growth and development, can favor the success of cacao in these regions (SANTOS *et al.*, 2017).

Nitrogen (N) fertilization is widely used during cacao cultivation because the high requirements of the plants for this nutrient (DANTAS *et al.*, 2012). Prado *et al.* (2012) state that the high nitrogen requirements make N deficiency the main cause of productivity loss during cacao cultivation. N is an essential nutrient for all plants and is a key participant in plant metabolism, and a prime constituent of amino acids, proteins, enzymes, nucleic acids, chlorophylls and hormones (TAIZ; ZEIGER, 2017).

In contrast to other nitrogenous sources, urea is notable for ease of market access, low cost per unit N, high solubility and compatibility when mixed with other fertilizers (SCIVITTARO *et al.*, 2004). However, it is susceptible to losses from ammonia volatilization, which can reach 70% depending on the soil and the application mode (CANTARRELLA *et al.*, 2008). A nitric source, in contrast, does not lose N via ammonia volatilization, nor does it acidify the soil, since it is already the final product of the transformation of N. However, it can be lost to leaching. Both forms can be used by plants depending on the species or genotype, as well as on the availability of carbohydrates for plant metabolism (ARAUJO *et al.*, 2012).

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.), da família Sterculiaceae, é uma planta perene e economicamente importante, principalmente como matéria-prima para a fabricação de chocolate (SCHMILDT *et al.*, 2017).

O Brasil já ocupou, na década de 80, a segunda posição na produção mundial de cacau, posição perdida na década de 90, principalmente pelo surgimento da vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, na principal região produtora do país, o Sul da Bahia (ZUGAIB; BARRETO, 2015). Em decorrência desse acontecimento, o Brasil passou do patamar de país exportador para importador de cacau. Em 2017, mais de 61 mil toneladas de cacau foram importadas de Gana (AIPC, 2018). Em 2018, a safra brasileira fechou em torno de 255.184 toneladas de amêndoas, sendo o estado da Bahia um dos maiores produtores, com 122.568 toneladas (IBGE, 2018).

A expansão da cacauicultura para áreas não tradicionais pode gerar divisas para o país, pela diminuição da importação, e, até mesmo, possibilitar ao país retornar ao papel de exportador de cacau. O cacau pode ser cultivado em regiões de semiárido que apresentam pluviosidade de 600 mm por ano, concentrada nos meses de dezembro a março, umidade relativa do ar em torno de 40 a 50%, luminosidade elevada e solos férteis (SEIXAS, 2004). Essas condições, associadas ao uso de irrigação, sombreamento de forma provisória com bananeira, mamão ou mandioca por até dois anos para que não haja prejuízos ao seu crescimento e desenvolvimento, podem favorecer o sucesso do cacau em nessas regiões (SANTOS *et al.*, 2017).

A adubação nitrogenada é amplamente utilizada no cultivo do cacau porque os requisitos nutricionais das plantas são elevados para esse nutriente (DANTAS *et al.*, 2012). Prado *et al.* (2012) afirmam que as altas exigências de nitrogênio (N) tornam sua deficiência a principal causa de perda de produtividade no cultivo do cacau. O N é um nutriente essencial e participa da constituição do vegetal, formando os aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, clorofilas e hormônios (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Em relação as fontes nitrogenadas, a ureia destaca-se pela facilidade de acesso no mercado, menor custo por unidade de N, elevada solubilidade e compatibilidade para uso em mistura com outros fertilizantes (SCIVITTARO *et al.*, 2004). No entanto, é uma fonte suscetível a perdas por volatilização de amônia e tais perdas podem chegar a 70% dependendo do solo e da forma de aplicação (CANTARRELLA *et al.*, 2008). A fonte nítrica, por sua vez, não perde N por volatilização da amônia, nem acidifica o solo, pois já é o produto final da transformação do N, mas pode ser perdida por lixiviação. Ambas as formas podem ser utilizadas pelas plantas em proporções que dependem da espécie ou do genótipo, bem como da disponibilidade de carboidratos para o metabolismo vegetal (ARAUJO *et al.*, 2012).

Accordingly, the aim of the current study was to evaluate the influence of nitrogen fertilization sources on the accumulation and distribution of carbohydrates by cocoa plants of different cacao clones and on the activity of an enzyme involved in their nitrogen metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were conducted in the experimental area of the Department of Technology and Social Sciences of Bahia State University, Juazeiro, Bahia state, Brazil (latitude: 9° 25'43" S, longitude: 40° 32'14" W, altitude: 384 m), between August 2013 and July 2014. The regional climate is classified as Bsw under the Köppen system, which corresponds to a hot semi-arid region with annual average rainfall of 500 mm, concentrated between November and April. The mean relative humidity and mean annual air temperature are 66% and 26.5 °C, respectively.

Experimental area soil is classified as a Flossic Neosol, with a sandy-loam texture (EMBRAPA, 2013). Soil samples were collected in the 0 - 0.20 m layer, processed, and a composite sample was sent for chemical characteristic analyze in laboratory the soil. The following results were obtained: pH in H₂O - 6.28; electrical conductivity - 0.28 dS m⁻¹; Ca⁺² - 9.61 cmol_c kg⁻¹; Mg⁺² - 4.84 cmol_c kg⁻¹; K⁺ - 1.68 cmol_c kg⁻¹; Na⁺ - 0.08 cmol_c kg⁻¹; H⁺ + Al⁺³ - 14.80 cmol_c kg⁻¹; T - 31.06 cmol_c kg⁻¹; P - 93.7 mg dm⁻³ and V - 52.1%.

Experimental form involved a fully randomized block design (5 x 2), 5 clones (PH16, CCN51, PS1319, CCN10 and TSH-1188) and 2 nitrogen sources (urea and calcium nitrate) with 3 replicates. Each experimental plot was composed of 2 plants.

Sixty cloned cacao plants obtained by cutting method were used. The plants were 4 years old. These were interplanted with the banana cultivar Preciosa, using a 3 x 3 m spacing.

During the experiment the following cultivation practices were adopted: irrigation, using a micro-sprinkler system with a 38 L h⁻¹ flow-rate; weed control via strimming; initial plant standardization via pruning, that left three branches on the main stem; nitrogen-based fertilization.

Cacao fertilization was carried out by canopy spraying, applying 40 kg ha⁻¹ of N, through the urea sources (CO (NH₂)₂ - 45% N) and calcium nitrate (CaNO₃ - 15.5% N), being divided into two applications (CAVALCANTI, 2008). Applications were made on April 2 and 23, 2014, when the plants were in the initial stages of production.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar em diferentes clones do cacauero a influência de fontes de adubação nitrogenada no acúmulo e distribuição de carboidratos pela planta e na atividade da enzima inserida no metabolismo do nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na área experimental do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais da Universidade do Estado da Bahia, em Juazeiro-BA (latitude: 9°25'43" S, longitude: 40°32'14" W, altitude: 384 m), no período compreendido entre agosto de 2013 e julho de 2014. O clima da região é classificado, segundo Köepen, como tipo Bsw, que corresponde a uma região semiárida quente, com precipitação pluviométrica média anual de 500 mm, e chuvas concentradas de novembro a abril. A umidade relativa média e a temperatura do ar média anuais são de 66% e 26,5 °C, respectivamente.

O solo da área experimental é classificado em Neossolo Flúvico, com textura franco-arenosa (EMBRAPA, 2013). Amostras do solo foram coletadas na camada 0 - 0,20 m, processadas, e uma amostra composta foi encaminhada para análise das características químicas, sendo obtidos os seguintes resultados: pH em H₂O - 6,28; condutividade elétrica - 0,28 dS m⁻¹; Ca⁺² - 9,61 cmol_c kg⁻¹; Mg⁺² - 4,84 cmol_c kg⁻¹; K⁺ - 1,68 cmol_c kg⁻¹; Na⁺ - 0,08 cmol_c kg⁻¹; H⁺ + Al⁺³ - 14,80 cmol_c kg⁻¹; T - 31,06 cmol_c kg⁻¹; P - 93,7 mg dm⁻³ e V - 52,1%.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados, em esquema fatorial (5 x 2), sendo 5 clones (PH-16, CCN-51, PS-1319, CCN-10 e TSH-1188) e 2 fontes de adubação nitrogenada (ureia e nitrato de cálcio), com 3 repetições. A parcela experimental foi composta por 2 plantas.

Foram utilizadas 60 plantas de cacaueros clonadas com 4 anos de idade, obtidas pelo método de estaquia, que eram intercaladas com bananeiras cv. Preciosa, em espaçamento de 3 x 3 m.

Durante o experimento foram adotadas as seguintes práticas culturais: irrigação, utilizando o sistema localizado por microaspersão (aspersores com vazão de 38 L h⁻¹); controle de ervas espontâneas, com auxílio de roçadeira costal; podas de padronização das plantas, deixando-se inicialmente três ramos (pernadas) dispostos intercalados no caule principal e adubação com fontes de nitrogênio.

A adubação de cobertura dos cacaueros foi realizada a lanço, na projeção da copa das plantas, aplicando-se 40 kg ha⁻¹ de N, por meio da fontes ureia (CO (NH₂)₂ - 45% de N) e nitrato de cálcio (CaNO₃ - 15,5% N), sendo parcelado em duas aplicações (CAVALCANTI, 2008). As aplicações foram realizadas nos dias 02 e 23 de abril de 2014, quando as plantas estavam no início da produção.

At 30 days after treatment application, biochemical analyzes of foliar tissue was performed. Samples involved two leaves per plant, exposed to sunlight, fully expanded, healthy and without signs of senescence. These leaves were placed in paper bags, identified by individual plant origin, stored in a greenhouse, at 60 °C for 72 h, then ground and weighed. This material was then used to obtain plant extracts, which were prepared with 0.5 g of homogenized dry vegetable tissue and 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0, with a final volume of 8 mL. The material was centrifuged at 4000 RPM for 20 minutes, supernatants were then collected with the aid of a pipette and then stored in eppendorfs and placed in a freezer - 20 °C.

In the obtained extracts, foliar levels of total soluble sugars (TSS) were assayed following the methodology of Yemm and Willis (1954); values for reducing sugars (RS) quantified by the dinitrosalicylate (DNS) method, which quantifies glucose, fructose and mannose in plant tissues (MILLER, 1959); total soluble proteins (TSP), following the method described by Bradford (1976); and the sucrose content was obtained by the difference of the values obtained for TSS and RS.

An *in vivo* nitrate reductase enzyme (NR) assay was also performed on experimental plant foliar and root tissue, following the methodology of Klepper *et al.* (1971). Roots and leaves were collected 45 days after treatment application, starting at 06:00, and soon after each individual harvest. Material was placed in individually labelled bags and packed on in insulated boxes, in order to avoid losses of tissue properties, and later triturated taking care to exclude leaf edges and veins. Following confirmatory weighing, 0.5 g of the material transferred to a beaker containing 8 ml of incubation medium, consisting of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 M potassium nitrate and 1% n-propanol (v/v). Beakers containing samples were placed in an oven at a temperature of 37 °C for a period of 1 h. The reaction medium consisted of 1 mL of 1% sulphanilamide in 1.5 N HCl, 1 mL of N-2-naphthyl ethylene, with the amount of nitrite formed during the assay determined colorimetrically by means of spectrophotometric readings of the reaction medium at 270 nm and compared to a standard nitrite curve. Enzyme activity was expressed in $\text{NO}_2 \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A chlorophyll meter (ClorofiLOG® model CFL 1030) was used to determine the chlorophyll indexes in the leaves under field conditions. The index is measured in dimensionless units, FCI (Falker Chlorophyll Index) values. For this evaluation two leaves per plant were selected, being the most exposed to sunlight, fully expanded, healthy and without signs of senescence.

Aos 30 dias após a aplicação dos tratamentos, foram realizadas as análises bioquímicas no tecido foliar, quando, inicialmente, selecionou-se duas folhas mais expostas à luz solar, totalmente expandidas, sem sinais de senescência e sadias. Essas folhas foram colocadas em sacos de papel, identificadas segundo sua procedência e levadas a estufa, a 60 °C por 72 h, sendo posteriormente moídas e pesadas. Esse material foi utilizado para obtenção dos extratos vegetais, que foram elaborados com 0,5 g do tecido vegetal seco homogeneizado e o tampão fosfato de potássio 0,1 M a pH 7,0, com volume final de 8 mL. O material foi submetido à centrifugação de 4000 RPM durante 20 minutos, sendo coletados os sobrenadantes com o auxílio de pipeta e em seguida armazenados em eppendorf e acondicionados em freezer -20 °C.

Nos extratos obtidos, foram avaliados os teores foliares de açúcares solúveis totais (AST), segundo metodologia descrita por Yemm e Willis (1954); os teores de açúcares redutores (AR), quantificados pelo método Dinitrossalicilato – DNS, que quantifica a glicose, frutose e manose nos tecidos vegetais (MILLER, 1959); proteínas solúveis totais (PTN), seguindo o método descrito por Bradford (1976); e o teor de sacarose foi obtido pela diferença dos valores obtidos para AST e AR.

Realizou-se ainda o ensaio *in vivo* da enzima Redutase do Nitrato (RN) no tecido foliar e radicular das plantas, seguindo a metodologia de Klepper *et al.* (1971). As raízes e folhas foram coletadas 45 dias após a aplicação dos tratamentos, a partir das 6 h da manhã, e logo após cada colheita individual, o material foi colocado em sacos previamente identificados e acondicionados em caixas térmicas contendo gelo, a fim de evitar perdas de propriedades pelos tecidos, posteriormente fragmentados tomando-se o cuidado de eliminar bordas e nervuras das folhas. Foi pesado 0,5 g do material, que foi transferido imediatamente após a pesagem para béqueres contendo 8 mL do meio de incubação, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), nitrato de potássio 0,1 M e 1% de n-propanol (v/v). Os béqueres contendo as amostras foram levados para estufa com a temperatura de 37 °C em período de uma 1 h. O meio de reação foi constituído por 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N, 1 mL de N-2-naftil etileno e a quantidade de nitrito formada neste ensaio determinou-se colorimetricamente através de leituras espectrofotométricas do meio de reação realizadas a 270 nm e comparadas a uma curva padrão de nitrito. A atividade da enzima será expressa em $\text{NO}_2 \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Para determinação dos índices de clorofila nas folhas, em condições de campo, empregou-se o clorofilômetro da marca comercial ClorofiLOG® modelo CFL 1030, que fornece resultados em unidades adimensionais, valores ICF (Índice de Clorofila Falker). Nessa avaliação selecionou-se duas folhas por planta, as mais expostas à luz solar, totalmente expandidas, sadias e sem sinais de senescência.

All data were submitted to analysis of variance, and means being compared with a Tukey test, at 5% probability, using the ASSISTAT program 7.7.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade, por intermédio do programa ASSISTAT 7.7.

RESULTS AND DISCUSSION

According to the analysis of variance of the studied factors (Table 1), there was a significant interaction between clones and N sources for most of the evaluated variables, except for the chlorophyll index.

No significant differences were observed between the cacao clones in chlorophyll a and b total index values: mean values being cl (a) = 30.11, cl (b) = 9.63 and cl (t) = 39.74. Mesquita *et al.* (2015), evaluating the chlorophyll content in imbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae), propagated by seed, grafting and cuttings and fertilized with calcium nitrate and urea, found results similar to those obtained in the current study. This may have occurred because the experimental area was homogeneous with respect to luminosity. According to Dantas *et al.* (2012), changes in chlorophyll content within the same species are correlated to the morphological adaptations that occur in response to environmental changes in light intensity.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância dos fatores estudados (Tabela 1), houve interação significativa entre os clones e fontes de N para a maioria das variáveis avaliadas, exceto para o índice de clorofila.

Na avaliação do índice de clorofila a, b e total, não foram constatadas diferenças significativas entre os clones de cacauzeiros, sendo que os valores médios obtidos foram cl (a) = 30,11, cl (b) = 9,63 e cl (t) = 39,74. Mesquita *et al.* (2015), avaliando os teores de clorofila em umbuzeiros propagados por semente, enxertia e estaquia e submetidos a adubação com nitrato de cálcio e ureia, encontraram resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho. Isso pode ter ocorrido devido a área de condução do experimento ser homogênea no que diz respeito ao fator luminosidade. Segundo Dantas *et al.* (2012), variações no teor de clorofila dentro de uma mesma espécie são correlatas às adaptações morfológicas ocorridas em resposta às variações de luminosidade no ambiente.

Table 1 - Summary of variance analysis for the variables evaluated in cacao clones in Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro – Bahia state, Brazil, 2014

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para as variáveis avaliadas em clones de cacauzeiros cultivados no Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro – BA, 2014

FV	CHLOROPHYLL INDEX	RS	TSS	TSP	NR _{LEAF}	NR _{ROOT}
Blocks	0.07 ^{ns}	0.48 ^{ns}	177.78 ^{ns}	2.28 ^{ns}	3.09 ^{ns}	1.39 ^{ns}
Fertilizer(A)	0.03 ^{ns}	3.50 ^{ns}	8.69 ^{**}	33.92 ^{**}	6.41 [*]	2.56 ^{ns}
Clones (B)	0.75 ^{ns}	88.15 ^{**}	166.68 ^{**}	22.25 ^{**}	14.25 ^{**}	15.96 ^{**}
A x B	0.32 ^{ns}	58.12 ^{**}	231.16 ^{**}	8.98 ^{**}	29.80 ^{**}	11.19 ^{**}
CV%	16.62	5.12	4.91	6.69	11.85	16.42

^{ns} Not significant; * Significant at 5% level; ** Significant at 1% level.

^{ns} Não significativo; * Significativo a 5% de probabilidade; ** Significativo a 1% de probabilidade.

When evaluating total soluble sugars (TSS) in plants fertilized with urea (Table 2), clone PH16 had the highest TSS content ($644.40 \mu\text{g AST g MS}^{-1}$), while clones PS1319 and CCN-51 had the lowest values than the other clones tested, but were not statistically different from each other. Calcium nitrate treated clone CCN-10 had the highest TSS content ($609.20 \mu\text{g AST g MS}^{-1}$), however, in the presence of urea, TSS levels were intermediate in comparison to other clones. Clones CCN-51 and PH16 had the lowest levels (235.19 and $254.27 \mu\text{g AST g MS}^{-1}$, respectively). This indicates that TSS values are influenced by the different N sources, since the clone PH16 had the highest TSS content when fertilized with urea, but the lowest when calcium nitrate was the N source.

Carbohydrates are of great importance for plants, and photoassimilates can be stored or distributed, via phloem, to various parts of the plant, directly influencing individual growth and crop productivity. Such source/sink-associated changes in photoassimilate distribution process, can be influenced directly by how each crop is grown, resulting in significant effects on translocation and fixed carbon allocation during the photosynthetic process (SILVA *et al.*, 2011).

Ao se avaliar os teores de açúcares solúveis totais (AST) em plantas submetidas à ureia (Tabela 2), verificou-se que o clone PH 16 apresentou teor AST superior ($644,40 \mu\text{g AST g MS}^{-1}$), e os clones PS 1319 e CCN 51 tiveram valores inferiores aos demais e não diferiram estatisticamente entre si. Para o tratamento com o nitrato de cálcio, observou-se que o clone CCN 10 apresentou maior teor de AST ($609,20 \mu\text{g AST g MS}^{-1}$) em relação aos demais, contudo, na presença de ureia, ele apresentou teor intermediário em relação aos demais clones. Já os clones CCN-51 e PH16 apresentaram os menores teores ($235,19$ e $254,27 \mu\text{g AST g MS}^{-1}$ respectivamente). Evidencia-se que os valores de AST sofrem influência das diferentes fontes de N, visto que o clone PH 16 obteve o maior teor de AST quando adubado com ureia e o menor quando a fonte de N foi o nitrato de cálcio.

Os carboidratos são de grande importância para as plantas, sendo que os fotoassimilados podem ser armazenados ou distribuídos via floema para as diversas partes do vegetal, influenciando diretamente no crescimento e produtividade da cultura. Essas alterações no processo de distribuição dos fotoassimilados via fonte/dreno, podem ser influenciadas diretamente por práticas culturais de cada cultura, refletindo-se em efeitos significativos na translocação e alocação de carbono fixado durante o processo fotossintético (SILVA *et al.*, 2011).

Table 2 - Total soluble sugars (TSS) and reducing sugar contents (RS), in leaves of cacao clones, receiving on one of two N sources, and grown in the Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro, Bahia, Brazil, 2014

Tabela 2 - Teores de açúcares solúveis totais (AST) e teores de açúcares redutores (AR), em folhas de clones de cacaueiros, submetidos aos tratamentos duas fontes de N, cultivados no Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro-BA, 2014

Clones ¹	Total soluble sugars ($\mu\text{g AST g MS}^{-1}$)		Reducing sugars ($\mu\text{mol AR g MS}^{-1}$)	
	N ₂ Source		N ₂ Source	
	Urea	Calcium Nitrate	Urea	Calcium Nitrate
CCN10	427.95 c B	609.20 a A	239.02 b A	185.25 b B
PS1319	242.76 d B	469.73 b A	162.59 c A	157.27 c A
CCN51	263.15 d A	235.19 d A	147.55 c B	248.74 a A
TSH 1188	504.27 b A	409.90 c B	245.96 b A	245.27 a A
PH16	644.40 a A	254.27 d B	309.80 a A	230.35 a B
C.V. (%)	5.12		4.91	

¹ Means followed by the same lowercase letter in the column and upper case in the row do not differ statistically (Tukey's test, 5% probability).

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Total soluble sugars are essentially composed of hexoses (reducers) and other higher chain sugars with storage and transport functions. Reducing sugars are mostly composed of glucose (MESQUITA *et al.*, 2015). According to Lima *et al.* (2002), the difference between the contents of TSS and RS represents the total availability of sugars with transport functions, (this being largely sucrose). Thus, the greater the differences between these sugars the higher the amount sucrose.

In terms of the reducing sugar (RS) contents of plants fertilized with urea (Table 2), a high content was observed in clone PH16 (309.80 $\mu\text{mol RS g MS}^{-1}$), while clones PS1319 and CCN51 had considerably less (162.59 and 147.55 $\mu\text{mol RS g MS}^{-1}$). For those treated with calcium nitrate, clones CCN51, TSH-1188 and PH16 did not vary statistically from each other, with all showing the highest RS levels (248.74, 245.27 and 230.35 $\mu\text{mol RS g MS}^{-1}$, respectively).

Reducing sugars, together with sucrose, are synthesized in the leaves and readily used by the plant metabolism, though only sucrose is translocated both day and night in all parts of the plant via the phloem (GALDIANO, 2008).

Total soluble protein (TSP) contents in cacao clone leaves are given in Figure 1. Higher protein levels when fertilization was performed with urea, were found for the clones CCN10, PS1319, TSH-1188 and PH16, the which did not differ statistically between them. Clone CCN51 had lower values.

Os açúcares solúveis totais são compostos basicamente por hexoses (reduzores) e outros açúcares de cadeias maiores com função de armazenamento e transporte. Já os açúcares redutores são compostos em sua maioria de glicose (MESQUITA *et al.*, 2015). Segundo Lima *et al.* (2002), a diferença entre os conteúdos de AST e AR representa a disponibilidade total de açúcares com função de transporte, principalmente a sacarose. Assim, as maiores diferenças entre esses açúcares indicam maiores quantidades de sacarose.

Em relação aos teores de açúcares redutores (AR) nas plantas adubadas com a ureia (Tabela 2), observou-se maior teor no clone PH16 (309,80 $\mu\text{mol AR. g MS}^{-1}$), enquanto que os clones PS1319 e CCN51 apresentaram os menores teores (162,59 e 147,55 $\mu\text{mol AR. g MS}^{-1}$). No tratamento com nitrato de cálcio, verificou-se que os clones CCN 51, TSH 1188 e PH16 não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram os maiores teores de AR (248,74; 245,27 e 230,35 $\mu\text{mol AR g MS}^{-1}$, respectivamente).

Os açúcares redutores, juntamente com a sacarose, são sintetizados nas folhas e prontamente utilizados pelo metabolismo, e somente a sacarose é translocada durante o dia e a noite em todas as partes da planta, através do floema (GALDIANO, 2008).

Os teores de proteínas solúveis totais (PTN) em folhas de clones de cacauzeiros são apresentados na Figura 1. Quando a fertilização foi realizada com ureia, foram verificados maiores teores de proteínas nos clones CCN 10, PS 1319, TSH 1188 e PH 16, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Teores inferiores foram observados no clone CCN 51.

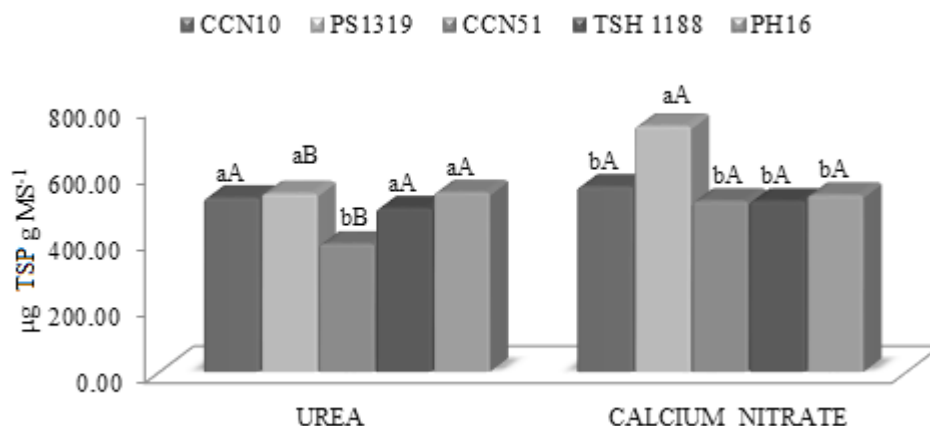


Figure 1 - Total soluble protein (TSP) content in leaves for five cacao clones grown under two forms of nitrogen fertilization (urea and calcium nitrate), and cultivated in the Vale do Submédio São Francisco. Juazeiro – Bahia State, Brazil, 2014.

Means followed by the same lowercase letter, within the N source, and capital letter between the N sources, are not significantly different (Tukey test, at 5% probability).

Figura 1 - Teores de proteínas solúveis (PTN) em folhas de cinco clones de cacauzeiros submetidos à duas fontes de adubação nitrogenada, ureia e nitrato de cálcio, cultivados no Vale do Submédio São Francisco. Juazeiro – BA, 2014. Médias seguidas de mesma letra minúscula, dentro da fonte de N e letra maiúscula entre as fontes de N, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

When treated with calcium nitrate, the highest TSP content was found in clone PS1319 (741.02 $\mu\text{g TSP g MS}^{-1}$). All other clones had lower levels and did not differ statistically. This between-clones variation in response to application of nitrogen sources is likely to have arisen because different species, or even genotypes within a plant species, may vary in their preferences for NO_3^- , NH_4^+ or even organic N, depending on selective pressures and physiological adaptations resulting from differences in N and carbohydrate availability, pH, temperature and light intensity (FORDE; CLARSON, 1999).

Of the two N sources, urea fertilization resulted in lower protein contents only in clones PS1319 and CCN51, a result indicating a metabolic limitation in urea assimilation. According to Martins (2015), a low urea assimilation efficiency may be more closely related to the absence of NO_3^- than to its inadequate absorption and hydrolysis, while a negative effect of NH_4^+ on plant development has been reported at lower concentrations than that associated with nutritional requirements. Urea can be absorbed directly by plant roots and leaves, but generally their absorption is lower than that of NO_3^- (MENGEL; KIRKBY, 1987).

Figure 2 shows the estimated sucrose levels in the leaf tissue of cacao clones fertilized with urea or calcium nitrate. It can be seen that clone PH16 fertilized with urea has the highest sucrose content (334.60 $\mu\text{g sucrose g MS}^{-1}$), which is the carbohydrate preferentially translocated via phloem. For clones fertilized with calcium nitrate, CCN10 had the highest sucrose content (423.95 $\mu\text{mol sucrose g MS}^{-1}$), while the lowest levels were found in clones CCN51 and PH16 (26.45 and 23.92 $\mu\text{g sucrose g MS}^{-1}$, respectively). Consequently, clones PH16 and CCN10 will have more energy available for investment in plant growth or even on increasing productivity.

Quando tratados com nitrato de cálcio, o maior teor de PTN foi obtido pelo clone PS1319 (741,02 $\mu\text{g PTN g MS}^{-1}$), e os menores teores foram observados nos demais clones analisados, que não diferiram estatisticamente entre si. Esse comportamento diferenciado entre os clones de cacauero em função da aplicação das fontes nitrogenadas pode ser atribuído ao fato que diferentes espécies ou até mesmo genótipos de uma espécie vegetal podem apresentar preferências por NO_3^- ou NH_4^+ ou mesmo N-orgânico, dependendo das pressões seletivas e adaptações fisiológicas oriundas da disponibilidade de N e carboidratos, pH, temperatura e intensidade luminosa (FORDE; CLARSON, 1999).

Dentre as fontes de N, a adubação com ureia determinou menores teores de proteínas apenas nos clones PS1319 e CCN51. Este resultado indica uma limitação metabólica na assimilação de ureia. Conforme Martins (2015), a baixa eficiência de assimilação da ureia tem sido mais relacionada à ausência de NO_3^- do que à absorção e hidrólise insuficientes, e seu efeito negativo no desenvolvimento das plantas tem sido reportado em menor intensidade do que aquele associado à nutrição com NH_4^+ . A ureia pode ser absorvida diretamente pelas raízes e folhas das plantas, mas geralmente sua absorção é menor que a do NO_3^- (MENGEL; KIRKBY, 1987).

A Figura 2 mostra os teores estimados de sacarose no tecido foliar de clones de cacaueros, submetidos a fertilização com ureia e nitrato de cálcio. Observa-se que o clone PH 16 adubado com ureia, tem maior teor de sacarose (334,60 $\mu\text{g sacarose g MS}^{-1}$), sendo este o carboidrato preferencialmente translocado via floema. Para os clones adubados com nitrato de cálcio, o maior teor de sacarose foi obtido pelo clone CCN10 (423,95 $\mu\text{mol sacarose g MS}^{-1}$), enquanto que os menores teores foram encontrados nos clones CCN 51 e PH 16 (26,45 e 23,92 $\mu\text{g sacarose g MS}^{-1}$ respectivamente). Fica evidente que os clones PH 16 e CCN 10 disponibilizam maior quantidade de energia que poderá ser gasta no crescimento da planta, ou mesmo, no aumento de sua produtividade.

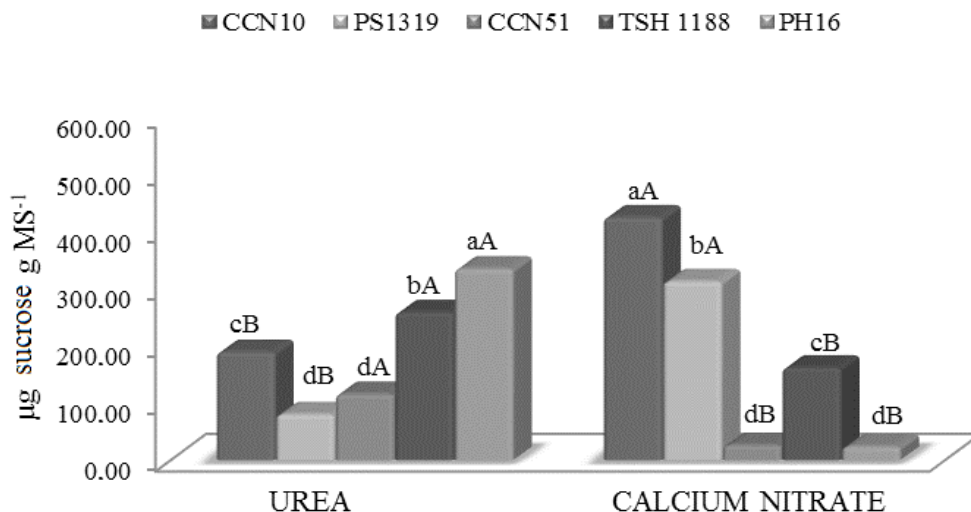


Figure 2 - Estimated sucrose content of leaf tissue for five cacao clones to fertilized with one of two nitrogen sources (urea or calcium nitrate), and cultivated in the Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro – Bahia, Brazil, 2014.

Means followed by the same lowercase letter, for the same N source, and capital letter for different N sources, did not differ significantly (Tukey test, at 5% probability).

Figura 2 - Teores estimados de sacarose no tecido foliar de cinco clones de cacau submetidos à duas fontes de adubação nitrogenada, ureia e nitrato de cálcio, cultivados no Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro – BA, 2014. Médias seguidas de mesma letra minúscula, dentro da fonte de N e letra maiúscula entre as fontes de N, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Data on nitrate reductase activity in leaf and root tissue of the five analysed cacao clones is given in Figures 3A and 3B. Under urea-based fertilization, clones CCN51 and PS1319 showed significantly higher leaf tissue nitrate reductase activity (3.98 and $3.34 \text{ NO}_2^- \text{ g MF h}^{-1}$, respectively) than other clones (Figure 3a). Clones TSH-1188 and PH16 both had low activity, but were not statistically different.

In the presence of calcium nitrate, the clone with the highest mean RN activity was PH16 ($4.02 \text{ NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$), a value that differed statistically from the other clones (Figure 3B). The influence of N distribution on metabolic behavior in the analysed clones is underscored by clone PH16, which in the presence of urea showed the lowest activity of the RN enzyme, but which, in the presence of calcium nitrate, had the highest values. However, Souza Junior and Carmello (2008), evaluating fertilization forms and urea doses for clonal cocoa seedlings, reporting that the plants were indifferent to the N source (either nitric, ammoniacal or combinations thereof), and responded similarly to urea application, when compared to ammonium sulfate, provided there was no deficiency. However, the authors do not mention the mechanism of the N metabolism involved.

A atividade da redutase do nitrato no tecido foliar e raízes dos diferentes clones de cacau é apresentada nas Figuras 3A e 3B. Na nutrição com ureia, observa-se que os clones CCN 51 e PS 1319 apresentaram significativamente maior atividade da redutase do nitrato no tecido foliar ($3,98$ e $3,34 \text{ NO}_2^- \text{ g MF h}^{-1}$, respectivamente) quando comparados com os demais (Figura 3a). Os clones TSH 1188 e PH 16 obtiveram menor atividade e não diferiram estatisticamente entre si.

Na presença do nitrato de cálcio, o clone que apresentou maior atividade da RN foi o PH 16, com média de $4,02 \text{ NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$, diferindo estatisticamente dos outros clones (Figura 3B). Ressalta-se a influência da forma de distribuição do N no comportamento metabólico dos clones, onde o clone PH 16 na presença de ureia apresentou a menor atividade da enzima RN, já na presença de nitrato de cálcio ocorreu o inverso. Entretanto, Souza Junior e Carmello (2008) avaliaram formas de adubação e doses de ureia para mudas clonais de cacau, relatando que as plantas são indiferentes à fonte de N, seja ela nítrica, amoniacal ou combinações destas e respondem similarmente à aplicação de ureia, quando comparada com o sulfato de amônio, desde que não haja deficiência de S para o seu crescimento. Contudo, os autores não mencionam como ocorre o metabolismo do N.

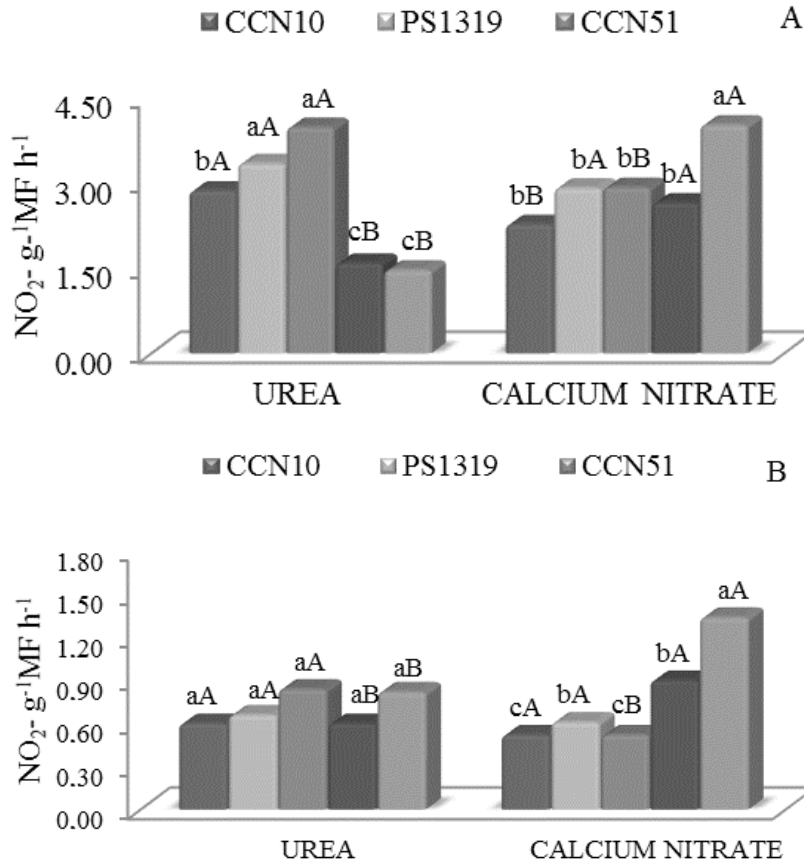


Figure 3 - Nitrate reductase activity in leaf (A) and root tissue (B) of five cacao clones grown with one of two sources of nitrogen fertilization (urea and calcium nitrate) in the Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro – Bahia state, Brazil, 2014.

Means followed by the same lowercase letter, for the same N source, and capital letter for different N sources, did not differ significantly (Tukey test, at 5% probability).

Figura 3 - Atividade da redutase no nitrato no tecido foliar (A) e no tecido radicular (B) de cinco clones de cacaueiros submetidos a duas fontes de adubação nitrogenada, ureia e nitrato de cálcio, cultivados no Vale do Submédio São Francisco, Juazeiro – BA, 2014. Médias seguidas de mesma letra minúscula, dentro da fonte de N e letra maiúscula entre as fontes de N, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

The results shown in Figure 3B, indicate that nitrate reductase activity in the cacao clone root systems ranged from 0.52 to 1.34 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$. In the treatment with urea, the clones did not differ statistically for RN root activity. For clones grown with calcium nitrate fertilization, difference between the clones occurred, with clone PH16 showing the highest values (1.34 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$), and lowest occurring in clones CCN10 (0.52 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$) and CCN51 (0.52 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$). It is important to note that using calcium nitrate as an N source, clone PH16 had the highest recorded RN enzyme activity levels in both leaf and root tissue.

Avaliando os resultados contidos na Figura 3B, verificou-se que a atividade da redutase do nitrato no sistema radicular de clones de cacaueiros variou de 0,52 a 1,34 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$. No tratamento com ureia, os clones não diferiram estatisticamente entre si quanto à atividade radicular da RN. Com relação aos clones submetidos à adubação com nitrato de cálcio, foi verificada a diferença entre os clones, apresentando maiores valores no clone PH 16 (1,34 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$) e menor nos clones CCN 10 (0,52 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$) e CCN 51 (0,52 $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$). É importante destacar que usando o nitrato de cálcio como fonte de N, o clone PH 16 manteve a maior atividade da enzima RN tanto no tecido foliar como no tecido radicular.

Comparing results obtained for leaf and root tissue, it is observed that N-based metabolic activity, in which the nitrate reductase enzyme is key, occurs preferentially in cocoa plant leaf tissue, regardless of the clone tested. This has also been observed for peach palm (*Bactris gasipaes*) by Oliveira *et al.* (2005) and by Oliveira *et al.* (2011) in horse-guava plants (*Campomanesia* sp., Myrtaceae), while Mesquita *et al.*, (2015) also recorded greater activity of nitrate reductase enzyme in imbu leaves.

In general, the processes of N reduction and assimilation can occur in the leaves and/or roots, either simultaneously or independently, according to the species and environmental conditions. In addition, the way N is supplied to the plant can also promote changes in the sites of reduction and assimilation (PATE *et al.*, 1980).

CONCLUSIONS

The different nitrogen sources used resulted in different physiological behaviors in the evaluated clones;

Independent of the nitrogen source, the nitrate reductase enzyme occurs preferentially in leaf tissue.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB: Foundation for Research Support of the State of Bahia) and Bahia State University (UNEB - DTCS) for granting the financial resources and providing the support needed to carry out the research.

Comparando-se os resultados obtidos entre o tecido foliar e radicular, observa-se que o metabolismo do N, o qual possui a enzima redutase do nitrato como ponto chave, ocorre preferencialmente no tecido foliar das plantas de cacau, independentemente do clone avaliado, o que também foi observado para pupunheira por Oliveira *et al.* (2005). Oliveira *et al.* (2011), em plantas de *Campomanesia* sp., e Mesquita *et al.*, (2015), em plantas de umbuzeiro, também observaram maior atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas.

De modo geral, os processos de redução e assimilação de N podem ocorrer nas folhas e/ou raízes, de maneira simultânea ou não entre esses órgãos, de acordo com a espécie e com as condições ambientais. Além disso, a forma como o N é fornecido à planta pode promover alterações nos sítios de redução e assimilação do mesmo (PATE *et al.*, 1980).

CONCLUSÕES

As diferentes fontes nitrogenadas apresentaram comportamento diferenciado com relação às características fisiológicas nos clones avaliados;

Independentemente da fonte nitrogenada, a enzima redutase do nitrato ocorre preferencialmente no tecido foliar.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e a Universidade do Estado da Bahia (UNEB – DTCS) pela concessão dos recursos financeiros e apoio necessário a realização da pesquisa.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- ARAUJO, J. L.; FAQUIN, V.; VIEIRA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. V. C.; RODRIGUES, C. R.; MESQUITA, A. C. Crescimento e produção do arroz sob diferentes proporções de Nitrato e de Amônio. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 36, n. 3, p. 921-930, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832012000300022>
- AIPC - Associação Nacional da Indústrias Processadoras de Cacau. Câmara Setorial, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/cacau/2018/42a-ro/aipc-camara-setorial-marco2018.pdf>. Arquivo consultado em 16 de Maio de 2019.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein principle of protein utilizing the -dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-258, 1976.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; CONTIN, T. L. M.; DIAS, F. L. F.; ROSSETO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R. B.; QUAGGIO, J. A. Ammonia volatilization from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p. 397-401, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162008000400011>
- CAVALCANTI, F. J. A. **Recomendações de adubação para o estado de Pernambuco** (2a aproximação). Recife: Instituto de Pesquisa Agropecuária, 2008. 198p.
- DANTAS, P. A. de S; SOUZA JUNIOR, J. O. de; GOMES, F. P.; RIBEIRO, D.O. Estimativa não destrutiva do teor foliar de nitrogênio em cacauzeiro utilizando clorofilômetro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 34, n. 3, p. 669-677, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000300004>
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, 2013. 353 p.
- FORDE, B.; CLARKSON, D. Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. **Advances in Botanical Research**, v. 30, p. 1-90, 1999.
- GALDIANO, L. C. **Qualidade da cana-de-açúcar (Saccharum spp) submetida à aplicação de maturadores químicos em final de safra**, Jaboticabal, São Paulo. 2008. 42p. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2018. [online] Disponível em: [http:// https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado](http://https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado). Arquivo consultado em 03 de Agosto de 2018.
- KLEPPER, L; FLESHER, D. F.; HAGEMAN, R. H. Generation of reduced nicotinamide-adenine- dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. **Plant Physiology**, v. 48, p. 580-590, 1971.
- LIMA, D. U.; OLIVEIRA, L. E. M.; SOARES, A. M.; DELÚ-FILHO, N. Avaliação sazonal da produção de borracha e da dinâmica de carboidratos solúveis em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista Árvore**, v. 26, n. 3, p. 377-383, 2002.
- MARTINS, L. E. C. **Absorção e assimilação da ureia por plantas de metabolismo fotossintético C3 e C4**, Viçosa, Minas Gerais. 2015. 34f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Bern : International Potash Institute, 1987. 687p.
- MESQUITA, A. C.; SOUZA, V.; FERREIRA, K. M.; MORAES, J. P. S.; SOUZA, M. A. Efeito da aplicação de fontes de nitrogênio em plantas de umbuzeiro propagadas via sexuada e assexuada. **Sodebras**, v. 10, n. 114, p. 9-13, 2015.
- MILLER, E. L. Use of dinitrosalicylic and reagent determination of sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- OLIVEIRA, L. J.; SILVA, S. M.; NETTO, A. P. C.; SILVA, S. M.; SILVA, F. M. S. M. Características agrônômicas e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Campomanesia* sp. sob estresse hídrico. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 11, p. 43-53, 2011.
- OLIVEIRA, M. A. J.; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; RODRIGUES, J. D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 515-22, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300005>
- PATE, T. S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 313-340, 1980.

- PRADO, R. M. **Nutrição de plantas: diagnose foliar em frutíferas**. Jaboticabal. p.443-476, 2012.
- SANTOS, R. R.; COSTA, K. P.; DE JESUS, M. S.; BARBOSA, L. O.; MARTINS, E. R. Avaliação de clones de cacau (*Theobroma cacao* L.) no Norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 2, p. 28-35, 2017.
- SCHMILDT, E. R.; TREVISAN, E.; BELIQUE, M.; SCHMILDT, O. Modelos alométricos para determinação da área foliar de cacauzeiro 'PH-16' em sombreamento e pleno sol. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i1.3938>
- SCIVITTARO, W. B.; OLIVEIRA, R. P.; MORALES, C. F. G. Adubação nitrogenada em porta-enxerto de limão cravo produzido em tubos dibble. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 131-135, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452004000100036>
- SEIXAS, B. L. S. **Água: Usos, características e potencialidades**. 1. ed. Cruz das Almas: Nova Civilização, 2004. 367 p.
- SILVA A. C. D. A.; LEONE, S.; SOUZA, A. P.; DE, VASCONCELLOS, M. A.; RODRIGUES, J. D.; DUCATTI, C. Alocação de fotoassimilados marcados e relação fonte-dreno em figueiras cv. Roxo de Valinhos. Relação fonte e dreno. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 3, p. 409-418, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v6i3a988>
- SOUZA JÚNIOR, J. O., CARMELLO, Q. A. C. Formas de adubação e doses de ureia para mudas clonais de cacau cultivadas em substrato. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. 6, p. 2367-2374, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832008000600015>
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.
- ZUGAIB, A. C. C.; BARRETO, R. C. S. O Mercado brasileiro de cacau: perspectivas de demanda, oferta e preços. **Agrotrópica**, v. 27, n. 3, p. 303-316, 2015.