



POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO

**METABOLISMO DO NITROGÊNIO E
CARBONO EM PLANTAS DE SERINGUEIRA
SUBMETIDAS À HIPOXIA E DIFERENTES
FONTES DE NITROGÊNIO**

LAVRAS - MG

2015

POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO

**METABOLISMO DO NITROGÊNIO E CARBONO EM PLANTAS DE
SERINGUEIRA SUBMETIDAS À HIPOXIA E DIFERENTES FONTES
DE NITROGÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carvalho, Pollyanna Aparecida de.

Metabolismo do nitrogênio e carbono em plantas de seringueira submetidas à hipoxia e diferentes fontes de nitrogênio / Pollyanna Aparecida de Carvalho – Lavras : UFLA, 2015.

168 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. *Hevea brasiliensis*. 2. Alagamento. 3. Metabolismo do nitrogênio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO

**METABOLISMO DO NITROGÊNIO E CARBONO EM PLANTAS DE
SERINGUEIRA SUBMETIDAS À HIPOXIA E DIFERENTES FONTES
DE NITROGÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de agosto de 2015.

Dr. Nelson Delú Filho	UNIS
Dr. João Paulo R. Alves Delfino Barbosa	UFLA
Dra. Ângela Maria Soares	UFLA
Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
Orientador

LAVRAS – MG

2015

A Deus,

OFEREÇO

**Aos meus pais, Sebastião e Marcia,
ao meu avô João e às minhas irmãs Mariana e Jullyanna com amor,**

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por me oferecer força em todas as horas.

A minha mãe, Marcia, e ao meu pai, Sebastião, pelo exemplo de vida, esperança, fé e coragem, obrigada por sempre acreditarem e confiarem em mim.

Ao meu avô João e as minhas irmãs Mariana e Jullyanna, pelas orações, pela ajuda, apoio e constante torcida.

Ao meu noivo Pedro e a toda sua família que também me ajudaram nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig e ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa;

Ao meu orientador, Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, pelos ensinamentos e amizade.

Ao professor, Ladaslav Sodek, (Unicamp), pelo apoio disponibilidade e atenção.

À Banca examinadora.

À minha amiga Débora que com certeza contribuiu para a concretização deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal: Lena, Dartagnan, Joel e Odorêncio, por toda a ajuda.

Aos colegas da Fisiologia Vegetal.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha caminhada até aqui.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO GERAL

O estudo teve como objetivo verificar alterações fisiológicas em plantas de seringueira submetidas à hipoxia, na presença de NO_3^- ou NH_4^+ . Avaliaram-se o metabolismo de carboidratos, o sistema antioxidante e a assimilação e transporte do nitrogênio (N). Dois experimentos foram instalados. No primeiro, plantas de 12 meses (RRIM 600) foram submetidas à solução nutritiva sem N, com 8 mM de N (KNO_3) ou 8 mM de N ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e duas condições de oxigênio, normoxia e hipoxia. As análises foram feitas aos 7, 14 e 21 dias após a indução dos tratamentos. No segundo, foi avaliada a interação NO_3^- ou NH_4^+ versus normoxia e hipoxia em plantas de seis meses (GT1). As análises foram realizadas às 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos. Os resultados mostraram que, nas raízes, o alagamento reduziu os teores de NO_3^- e N total assim como a atividade do sistema GS/GOGAT. Por outro lado, elevou a atividade da RN, as quantidades de NH_4^+ e aminoácidos livres totais. No xilema, a hipoxia favoreceu o transporte de NH_4^+ e reduziu o transporte de NO_3^- . A composição de aminoácidos na raiz e na seiva foi alterada em relação ao aumento de alanina e Gaba a partir do consumo de aspartato e glutamato. Nas folhas, o tratamento hipóxico reduziu os teores de NO_3^- e aminoácidos totais, o oposto ocorreu com os teores de NH_4^+ , atividades da GS/GOGAT e GDH e concentrações de serina, glicina e alanina. Sob hipóxia a fotossíntese, a condutância estomática, taxa transpiratória, conteúdo de carboidratos e atividades das invertases diminuíram independente da fonte nitrogenada. As atividades da SOD, CAT, APX e conteúdo de H_2O_2 aumentaram nas plantas sob déficit de oxigênio tanto nas folhas quanto nas raízes. A assimilação do nitrogênio e do carbono e o sistema antioxidante foram afetados em plantas de seringueira sob hipoxia. No entanto, quando se compara as plantas tratadas com NO_3^- com as tratadas com NH_4^+ , as primeiras apresentaram respostas mais favoráveis, indicando que o metabolismo do NO_3^- minimizou os efeitos do alagamento.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*. Alagamento. Metabolismo do nitrogênio. Metabolismo do carbono. Sistema antioxidante. Nitrato. Amônio.

GENERAL ABSTRACT

In this study, we aimed at evaluating the physiological changes in rubber tree plants under hypoxia in the presence of NO_3^- or NH_4^+ . We evaluated the carbohydrate metabolism, antioxidant system and nitrogen (N) assimilation and transport. Two experiments were conducted. In the first, 12 months old plants (RRIM 600) were subjected to nutrient solution N free, with 8 mM N (KNO_3) or 8 mM N ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and two oxygen conditions, normoxia and hypoxia. Analyzes were performed at 7, 14 and 21 days after treatments induction. In the second, we evaluated the NO_3^- or NH_4^+ interact *versus* oxygen conditions in six months old plants (GT1). Analyzes were performed at 12, 24, 48 and 72 hours after treatments induction. The results showed that, in the roots, flooding reduced NO_3^- and N content and the activity of the GS/GOGAT system. In addition, increased NR activity and NH_4^+ and free amino acids quantities. In the xylem, hypoxic treatment favored NH_4^+ transport and reduced NO_3^- transport. The amino acid composition of both root and xylem sap changed in relation to the increase in Gaba alanine from aspartate and glutamate consumption. In the leaves, hypoxic stress reduced NO_3^- and total amino acids content. The opposite occurred with NH_4^+ content, GS/GOGAT and GDH activities and serine, glycine and alanine concentrations. In addition, photosynthesis, stomatal conductance, transpiration rate, carbohydrate content and invertase activities decreased in the stressed plants, on the other hand, SOD, CAT, APX activities and H_2O_2 content increased in both leaves and roots, regardless nitrogen source. We verified that there were changes in nitrogen and carbon metabolisms, as well as in the antioxidant system of rubber trees under hypoxic conditions. We also found that NO_3^- and NH_4^+ influenced plant response to hypoxia in different ways. The comparison between the nitrogen sources showed that NO_3^- metabolism minimized the effects of flooding.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Flooding. Nitrogen metabolism. Carbon Metabolism. Antioxidant system. Nitrate. Ammonium.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nas atividades das enzimas redutase do nitrato (A), glutamina sintetase (B), glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (C) e desidrogenase do glutamato (D), nas raízes de plantas de seringueira 71
- Figura 2 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no transporte de nitrato (A) e de amônio (B), no xilema de plantas de seringueira 73
- Figura 3 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos no xilema de plantas de seringueira..... 78

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nas atividades das enzimas redutase do nitrato (A), glutamina sintetase (B), glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (C) e desidrogenase do glutamato (D), nas raízes de plantas de seringueira 99
- Figura 2 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrato (A), e de amônio (B), nas raízes de plantas de seringueira 102
- Figura 3 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrogênio total (A), e aminoácidos livres totais (B), nas raízes de plantas de seringueira 103

Figura 4	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no transporte de nitrato (A), e de amônio (B), no xilema de plantas de seringueira	109
Figura 5	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nas atividades das enzimas glutamina sintetase (A), glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (B) e desidrogenase do glutamato (C), nas folhas de plantas de seringueira	114
Figura 6	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrato (A), e de amônio (B), nas folhas de plantas de seringueira	116
Figura 7	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrogênio total (A), e aminoácidos livres totais (B), nas folhas de plantas de seringueira	117

CAPÍTULO 4

Figura 1	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no teor de clorofila (A), na matéria seca foliar (B), e na massa seca radicular (C) de plantas de seringueira.....	138
Figura 2	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na taxa fotossintética líquida (A), e na relação C_i/C_a (B), de plantas de seringueira	141
Figura 3	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na condutância estomática (A), e na taxa transpiratória (B), de plantas de seringueira	142
Figura 4	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase ácida do vacúolo em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	145

Figura 5	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase neutra do citosol em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	146
Figura 6	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase ácida da parede celular em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira.....	147
Figura 7	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares solúveis totais em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	150
Figura 8	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares redutores em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	151
Figura 9	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na concentração de sacarose em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	152
Figura 10	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da dismutase do superóxido em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	156
Figura 11	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da peroxidase do ascorbato em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	157
Figura 12	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da catalase em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	158
Figura 13	Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no conteúdo de H ₂ O ₂ em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira	159

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de normoxia, NO_3^- (8 mM), NH_4^+ (8 mM) ou (0 mM) de nitrogênio (-N) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 21 dias. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 7, 14 e 21 dias após a indução do tratamento. 75
- Tabela 2 Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de hipoxia NO_3^- (8 mM), NH_4^+ (8 mM) ou (0 mM) de nitrogênio (-N) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 21 dias. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 7, 14 e 21 dias após a indução do tratamento 76

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas raízes de plantas de seringueira sob condição de normoxia..... 105
- Tabela 2 Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas raízes de plantas de seringueira sob condição de hipóxia..... 106
- Tabela 3 Médias da composição de aminoácidos (mol%) nas raízes de plantas de seringueira sob condições de normoxia e de hipoxia 107

Tabela 4	Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de normoxia	110
Tabela 5	Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de hipoxia.....	111
Tabela 6	Médias da composição de aminoácidos (mol%) na seiva de plantas de seringueira sob condições de normoxia e de hipoxia	112
Tabela 7	Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas folhas de plantas de seringueira sob condição de normoxia.....	118
Tabela 8	Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas folhas de plantas de seringueira sob condição de hipoxia.....	119
Tabela 9	Médias da composição de aminoácidos (mol%) nas folhas de plantas de seringueira sob condições de normoxia e de hipoxia	120

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	A cultura da seringueira	19
2.2	Metabolismo do carbono	21
2.2.1	Metabolismo do carbono em seringueira	25
2.3	Metabolismo do nitrogênio	25
2.3.1	Assimilação e transporte do N em seringueira	30
2.4	Alterações metabólicas em plantas com sistema radicular sob deficiência de O₂	34
	REFERÊNCIAS	44
	CAPÍTULO 2 Assimilação e transporte de nitrogênio em plantas de seringueira submetidas à hipoxia durante 21 dias na ausência ou presença de nitrogênio	58
1	INTRODUÇÃO	60
2	MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.1	Cultivo das plantas e condições experimentais	63
2.2	Tratamentos e coletas	63
2.3	Avaliação das enzimas de assimilação do nitrogênio	64
2.4	Determinações de aminoácidos, NO₃⁻ e NH₄⁺	65
2.5	Análises estatísticas e delineamento experimental	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1	Assimilação de NO₃⁻ e NH₄⁺ nas raízes	67
3.2	Compostos nitrogenados transportados na seiva do xilema	72
4	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80
	CAPÍTULO 3 Assimilação, transporte e distribuição de compostos nitrogenados em plantas de seringueira submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio durante 72 horas na presença de nitrato ou amônio	85
1	INTRODUÇÃO	87
2	MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1	Cultivo das plantas e condições experimentais	90
2.2	Tratamentos e coletas	90
2.3	Características avaliadas	91
2.3.1	Coleta da seiva do xilema	91
2.4	Enzimas de assimilação do N	91
2.5	Determinação de N total, aminoácidos livres totais, NO₃⁻ e NH₄⁺	93

2.6	Separação e análise da composição dos aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência	93
2.7	Análises estatísticas e delineamento experimental.....	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1	Assimilação do NO_3^- e NH_4^+ nas raízes.....	96
3.2	Teores de NO_3^- , NH_4^+ , N total e aminoácidos livres totais nas raízes	100
3.3	Composição de aminoácidos nas raízes	104
3.4	de Compostos nitrogenados transportados na seiva do xilema	107
3.5	Assimilação do N nas folhas.....	112
3.6	Teores de NO_3^- , NH_4^+ , N total e aminoácidos livres totais nas folhas.....	115
3.7	Composição de aminoácidos nas folhas	118
4	CONCLUSÃO	121
	REFERÊNCIAS	122
	CAPÍTULO 4 Metabolismos do carbono e antioxidante em plantas de seringueira (<i>Hevea spp</i>) submetidas à hipoxia durante 72 horas na presença de nitrato ou amônio	128
1	INTRODUÇÃO	130
2	MATERIAIS E MÉTODOS	132
2.1	Cultivo das plantas e condições experimentais	132
2.2	Tratamentos e coletas.....	132
2.3	Avaliações das trocas gasosas e do teor de clorofila	133
2.4	Atividade das isoformas de invertase.....	133
2.5	Determinação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose.....	134
2.6	Enzimas do metabolismo antioxidante e conteúdo de H_2O_2	135
2.7	Delineamento Experimental	136
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
3.1	Teor de clorofila e produção de matéria seca	137
3.2	Trocas gasosas.....	139
3.3	Atividade das isoformas de invertase.....	143
3.4	Açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose	148
3.5	Atividade das enzimas SOD, APX E CAT e conteúdo de H_2O_2	153
4	CONCLUSÃO	162
	REFERÊNCIAS	163

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A seringueira, pertencente ao gênero *Hevea*, da família Euphorbiaceae, a *Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Muell.-Arg. é a espécie mais importante do gênero, estando entre as plantas de interesse econômico no mundo por ser produtora de borracha natural, produto largamente utilizado na fabricação de um grande número de manufaturados (IAC, 2014). Nativa da região amazônica, seu cultivo tem se expandido para várias regiões, principalmente devido a sua importância em termos de mercado, sobretudo pela perspectiva da demanda futura de borracha natural. A tecnologia disponível tem dado suporte a essa expansão, porém, ainda há necessidade do desenvolvimento e difusão de sistemas de produção adaptados às condições edafoclimáticas distintas, de maneira que assegurem a competitividade do negócio em qualquer situação (HERNANDES; FERES, 2006).

A ocorrência natural da espécie está sujeita a ambientes com alagamentos periódicos, como às margens de rios e lugares inundáveis de mata de terra firme, sendo a produtividade afetada sob tais condições (MORAES, 1978). As plantas submetidas à condição de excesso de água no solo têm o suprimento de oxigênio (O_2) para o sistema radicular dificultado, devido à baixa taxa de difusão desse gás em meio aquoso (ARMSTRONG, 1979). Sabe-se que o O_2 desempenha um papel primordial na bioquímica e desenvolvimento das plantas e, dada a sua grande importância no metabolismo aeróbico, sua privação constitui uma condição altamente estressante. Esse estresse afeta profundamente o crescimento e sobrevivência de muitas espécies, tanto em ecossistemas agrícolas quanto naturais, influenciando negativamente a produtividade de

culturas economicamente importantes (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008; IRFAN et al., 2010).

A deficiência de O_2 provoca uma diminuição da fosforilação oxidativa e um consequente aumento relativo da produção de ATP por glicólise citosólica, resultando em alterações na síntese e no consumo de carboidratos. A falta do acceptor final da cadeia respiratória mitocondrial resulta também, na inibição de processos que demandam energia e na estimulação de vias anaeróbicas, buscando a manutenção da carga energética celular (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

O déficit de O_2 nas raízes afeta não apenas as funções relacionadas a esse órgão, como absorção de água e nutrientes, mas também, a planta como um todo, interferindo na assimilação líquida de CO_2 , na condutância estomática, na taxa transpiratória e na translocação de carboidratos (KREUZWIESER et al., 2004). A taxa fotossintética e de transporte de assimilados determinam a translocação de carboidratos das folhas para as raízes e, assim como o catabolismo desses fotoassimilados dentro das raízes, são processos afetados em condições de alagamento (hipoxia). A redução da fotossíntese sob deficiência de O_2 , possivelmente ocorre pelo fechamento estomático, diminuição da atividade da enzima de carboxilação ou redução do conteúdo de clorofila (MIELKE et al., 2003). Sendo os produtos fotossintéticos fontes primárias de energias para as plantas, o fornecimento de carboidratos para as raízes, em condições hipóxicas, se torna ainda mais importante devido à baixa eficiência da produção de ATP nessa situação (VARTAPETIAN; JACKSON 1997).

Além dessas alterações, importantes rotas metabólicas podem ser acionadas em plantas submetidas à hipoxia, como por exemplo, a ativação de um sistema antioxidante responsável por impedir o aumento descontrolado de radicais livres nas células (BLOKHINA et al., 2003), bem como a produção e interconversão de aminoácidos a partir do piruvato acumulado (MIYASHITA;

GOOD, 2008). Como estratégia de proteção aos danos oxidativos e para eliminação das espécies reativas geradas sob condições de estresse, as plantas desenvolveram um complexo sistema enzimático de defesa, que inclui a dismutase do superóxido (SOD), que catalisa a conversão do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX), que podem quebrar o H_2O_2 em H_2O e O_2 (MANIVANNAN et al., 2008; JALEEL et al., 2009).

Condições hipóxicas, também podem levar a alterações no metabolismo do nitrogênio (N), uma vez que este é um processo exigente em termos de energia, a sua assimilação e têm implicações relevantes sobre o estado energético das células vegetais. Desse modo, a assimilação desse nutriente torna-se importante em ambientes que a disponibilidade de O_2 é restringida, onde há uma diminuição na relação ATP/ADP (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

As diferentes formas de N, disponíveis no substrato podem afetar as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas, a exemplo do crescimento de raízes, taxas fotossintéticas, condutância do mesófilo, quantidades de proteínas e açúcares, bem como atividade catalítica de diversas enzimas (LI et al., 2013). Estudos comparando a nutrição com nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) mostram que essas fontes nitrogenadas podem induzir respostas metabólicas distintas (ESCOBAR et al., 2006; PATTERSON et al., 2010). Muitos trabalhos têm demonstrado que a aplicação de NO_3^- como fertilizante nitrogenado melhora a tolerância e a sobrevivência de diversas espécies vegetais submetidas à baixa concentração de O_2 (MALAVOLTA, 1954; TROUGHT; DREW 1981; ALLEGRE et al., 2004; THOMAS; SODEK, 2005; HORCHANI et al., 2010). No entanto, em plantas sob esse estresse, os dados referentes ao metabolismo e aos mecanismos pelos quais este ânion e outros compostos nitrogenados atuam ainda não são completamente elucidados (SOUSA; SODEK 2002; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

Tendo em vista que as respostas das plantas à condição de hipoxia podem variar de acordo com a espécie, severidade e duração do estresse (HONG-BO et al., 2008), o presente estudo teve como objetivo verificar alterações fisiológicas em plantas de seringueira submetidas à hipoxia, na presença de diferentes fontes de N (NO_3^- ou NH_4^+). Foram verificadas as alterações nas trocas gasosas, no metabolismo de carboidratos, no sistema antioxidante e na assimilação, conteúdo e transporte do N nessas plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da seringueira

O gênero *Hevea*, pertence à Família Euphorbiaceae e dentre os gêneros importantes da cultura tropical pertencentes a esta família, destacam-se *Ricinus* (mamona), *Manihot* (mandioca) e *Hevea* (seringueira). A classificação atual do gênero *Hevea* compreende 11 espécies de seringueiras, sendo elas: *H. brasiliensis*; *H. guianensis*; *H. benthamiana*; *H. nitida*; *H. rigidifolia*; *H. camporum*; *H. sipruceana*; *H. microphylla*; *H. camargoana*; *H. paludosa*; *H. pauciflora*, das quais a *Hevea brasiliensis* (Wild. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg. destaca-se por apresentar maior capacidade produtiva e elevada qualidade do látex. Sendo, portanto, a única espécie cultivada e explorada comercialmente (SECCO, 2008).

Nativa da região Amazônica, sua ocorrência natural está circunscrita aos limites dessa região brasileira e aos países limítrofes como a Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Guianas, Suriname e Venezuela (GONÇALVES et al., 1990). O cultivo da *Hevea brasiliensis* pode se estender desde as latitudes de 3° N e 15° S até as latitudes 24° N e 25° S, caracterizando uma alta capacidade de adaptação às diversas condições climáticas (SEAG/ES, 2014).

A heveicultura destaca-se tanto no âmbito social quanto econômico e ambiental. Sua importância socioeconômica se dá através da fixação do homem no campo e da geração de emprego e renda. (ROSADO, 2006). Ambientalmente a cultura da seringueira contribui para a redução do efeito estufa, devido a sua alta capacidade de sequestro de carbono e, conseqüentemente, melhora a qualidade do ar atmosférico, através da transformação de parte do gás carbônico (CO₂) em biomassa vegetal. O cultivo dessa espécie gera reduções certificadas de emissões de 250 toneladas de CO₂/ha/ano. Além disso, trata-se também de

uma planta que pode atuar na proteção do solo contra erosão e na recuperação de áreas degradadas (COTTA et al., 2006).

Atualmente, os maiores produtores mundiais de borracha natural são os países asiáticos, principalmente Tailândia, Indonésia, Malásia, Índia e Vietnã, que juntos são responsáveis por cerca de 80% da produção (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2015). No ano de 2014, a produção mundial de borracha natural cresceu 1,2%, enquanto o consumo elevou-se em 4,0% (IRSG, 2014), dessa forma a demanda mundial por borracha supera o crescimento da produção mundial como um todo e, caso a demanda continue crescendo com a atual taxa, o mundo enfrentará um déficit na oferta de borracha natural de 1 milhão de toneladas em 2020 (COSTA et al., 2008).

A história da produção de borracha natural brasileira mostra que o país foi o principal produtor e exportador mundial entre o final do século XIX e início do século XX, passando a ser importador desta matéria-prima (BERNARDES et al., 2000). Apesar de ser o país de origem da *H. brasiliensis* e possuir áreas aptas ao seu cultivo, a contribuição do Brasil na produção mundial tem sido quase insignificante, em torno de 1,5% (*International Rubber Study Group*, 2014). Essa produção está concentrada nos estados de São Paulo (53,3%), Bahia (15,9%), Mato Grosso (8,9%), Minas Gerais (6,3%), Goiás (4,7) e Espírito Santo (3,8%) (CEPLAC, 2014). Dados recentes mostram que atualmente, o país consome 395 mil toneladas de borracha por ano e produz apenas 178 mil toneladas, tendo que suprir o déficit com importações (MAPA, 2013).

Logo, verifica-se que a atual produção de borracha natural tem sido insuficiente para atender a demanda que vem aumentando significativamente a cada ano. Isto tem causado uma escassez de matéria prima a qual tem sido suprida, em parte, pela utilização da borracha proveniente do petróleo. Porém, em muitos casos a borracha natural é insubstituível, devido às suas

características químicas e físicas (ROSADO, PIRES; SANTOS, 2006). Conseqüentemente, a heveicultura tem se tornado uma atividade promissora especialmente no Brasil, já que o país produz menos de um terço do que é demandado.

Dessa maneira, o fortalecimento da heveicultura seria uma alternativa para minimizar esse déficit, visando à autossuficiência ou, até mesmo, fazer com que o país ocupe novamente uma posição de relevância na produção mundial de borracha. Contudo, um ponto que merece destaque em relação ao desenvolvimento dessa cultura é a carência de investigações científicas que englobem desde aspectos básicos a aplicados. Portanto, a expansão da heveicultura depende de estudos que busquem novas tecnologias para a exploração apropriada da espécie, levando em consideração os principais aspectos fisiológicos e metabólicos relacionados ao comportamento dessas plantas visando maximizar sua produtividade em diferentes condições de ambientes.

2.2 Metabolismo do carbono

O desenvolvimento das plantas depende tanto da quantidade de carbono fixado na fonte, como da intensidade com que ele é exportado e utilizado pelos drenos (ROLLAND et al., 2002). Em plantas do tipo C3 a fixação de CO₂ é catalisada pela Rubisco que tem uma baixa afinidade por CO₂, quando comparada a PEPcarboxilase. Além disso, devido à dupla função da enzima, a reação de carboxilação compete com a ação oxigenase, sendo até 50% de todo o N foliar alocado em favor da síntese de Rubisco (ELLIS, 1979).

No ciclo de Calvin, a partir da ação da Rubisco, há produção das trioses-fosfato que são exportadas do cloroplasto, em troca por fosfato inorgânico, para a síntese citosólica de sacarose. A biossíntese de sacarose é catalisada

predominantemente pela ação sequencial das enzimas sacarose fosfato sintase (SPS) e sacarose-6-P fosfatase, ainda que possa ocorrer pela ação da enzima sacarose sintase (EC 2.4.1.13) (SuSy). Entretanto, a ação da SuSy é considerada bastante modesta nas reações de síntese atuando de forma mais expressiva no sentido inverso, o da hidrólise de sacarose (HUBER; HUBER, 1996).

Após ser sintetizada, em uma trajetória que tem início com o carregamento do floema, a sacarose é exportada a partir das folhas, para suprir a demanda da planta com carbono e energia, requeridos tanto para a manutenção e crescimento como para o armazenamento de reservas (LUNN; FURBANK; 1999). O caráter não redutor da molécula é o principal motivo que explica a sua larga distribuição e utilização nas plantas superiores (TUPY; PRIMOT, 1982). Além da sua posição central como uma molécula energética, este dissacarídeo tem um papel importante no particionamento de carboidratos e atua como molécula sinalizadora agindo em diferentes processos que regulam o ciclo de vida das plantas (RUAN, 2014).

A hidrólise da sacarose em hexoses tem como objetivo fornecer substrato para a respiração celular (OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008). Duas rotas alternativas são responsáveis pela clivagem da ligação glicosídica. Uma dessas rotas envolve a hidrólise irreversível de sacarose, a glicose e frutose, via invertase (EC 3.2.1.26), que é uma enzima que possui um baixo K_m para sacarose (7 a 15 mM) (AVIGAD, 1982). Após esta etapa, ocorre uma fosforilação de glicose e frutose, em reações catalisadas por várias hexoquinases e frutoquinases, usando ATP como doador de energia (RENZ; STITT, 1993). A outra rota de hidrólise, exclusiva de plantas, é catalisada pela SuSy e envolve a clivagem da sacarose dependente de UDP, produzindo UDP-glicose e frutose, principalmente nas regiões em crescimento. O K_m da SuSy para a sacarose é relativamente alto (40 a 200 mM) e a atividade da enzima é limitada pelas

concentrações de sacarose e UDP no citosol (AVIGAD, 1982; LOEFI et al., 1999).

Existem algumas isoformas de invertase, com diferentes propriedades bioquímicas e localizações subcelulares (KOCH, 2004). Segundo Sturm (1999), as funções específicas das diversas isoformas de invertase, parecem regular a entrada de sacarose nas suas diferentes vias de utilização.

A maioria das espécies contém isoformas de invertase vacuolar, que se acumulam como proteínas solúveis (invertases ácidas solúveis) no lúmen deste compartimento (KOCH, 2004). A invertase vacuolar pode desempenhar um papel importante na expansão celular (GONZÁLEZ et al., 2005), no aumento da turgescência que pode levar a resistência aos fatores de estresse. Existem também, isoformas de invertase (invertases de parede celular) que são ligadas à parede celular, cuja função é mais proeminente em drenos sem ligações por plasmodesmas entre as células (PROELS et al., 2006; HIRSCHKE et al., 2009; KANG et al., 2009). Invertases de vacúolo e de parede celular promovem a clivagem de sacarose com maior eficiência, quando submetidas a níveis de pH situados entre 4,5 e 5,0 (STURM, 1999). Além disso, as plantas têm também duas isoformas de invertases citosólicas, denominadas neutras ou alcalinas, cuja atividade hidrolítica é maximizada em níveis de pH situados entre 7,0 e 7,8 (QUICK; SCHAFFER, 1996). A invertase neutra é considerada uma enzima de manutenção, envolvida na degradação de sacarose, quando as atividades da invertase ácida e da SuSy são baixas (COPELAND, 1990).

Os produtos das reações sacarolíticas, isto é, as hexoses (frutose e glicose) são os substratos para o processo respiratório. Via de regra, a respiração inicia-se com a glicólise, sendo seus produtos, substratos para o ciclo de Krebs e, conseqüentemente, para a cadeia respiratória.

Na glicólise, os carboidratos são convertidos a piruvato no citosol, produzindo NADH e ATP. Nas etapas iniciais, os carboidratos são convertidos

em hexoses fosfato, que em etapa posterior são quebradas em duas trioses fosfato, as quais, em uma etapa conservadora de energia, são oxidadas e rearranjadas, produzindo duas moléculas de piruvato. Quando o O_2 não está disponível, como no caso de condições de alagamento, a glicólise atua como fonte principal de energia para as células, uma vez que por meio da fermentação há redução do piruvato para reciclar o NADH produzido na glicólise. No ciclo do ácido cítrico, o piruvato é oxidado dentro da matriz mitocondrial, gerando um grande número de equivalentes redutores na forma de NADH e $FADH_2$. Para iniciar o ciclo de Krebs, o piruvato, produzido durante a glicólise no citosol, deve ser transportado pela membrana impermeável interna da mitocôndria, por meio de uma proteína específica de membrana. Subsequentemente, ocorre o ciclo de Krebs que, em síntese, constitui de oito etapas catalisadas por enzimas, começando com a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato para formar o ácido cítrico. Os carbonos derivados do acetil-CoA são liberados na forma de CO_2 . O ciclo inclui ainda quatro reações de oxidação, as quais produzem três moléculas de NADH e uma de $FADH_2$. Uma molécula de ATP é formada pela fosforilação ao nível do substrato. Para finalizar, o oxaloacetato é regenerado, permitindo a continuação do ciclo. A terceira etapa da respiração corresponde à fosforilação oxidativa, na qual os elétrons do NADH e $FADH_2$ passam pela cadeia de transportadora, na membrana mitocondrial interna para reduzir o O_2 , receptor final de elétrons. A energia química é conservada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons, que é criado pelo acoplamento do fluxo de elétrons ao bombeamento de prótons da matriz ao espaço intermembrana e posteriormente, essa energia é convertida em energia química na forma de ATP (TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.2.1 Metabolismo do carbono em seringueira

A seringueira é considerada como um sistema produtivo composto por folhas que são responsáveis pela produção de fotoassimilados, e por outros órgãos que são consumidores desses assimilados, pelo menos em uma parte de sua vida. A biossíntese de látex e conseqüentemente, a produção de borracha é o resultado de uma complexa cadeia de eventos biofísicos, nutricionais e metabólicos que estão relacionados com fatores diversos, tais como a variação das condições climáticas, a produção e o transporte de fotoassimilados, a disponibilidade de carboidratos de reserva e a demanda por outros tecidos drenos das árvores (Mesquita et al., 2006; Cairo et al., 2009).

Nas folhas de seringueira (tecidos-fontes) através do processo fotossintético, é produzido o substrato para a síntese de borracha, a sacarose, a qual será posteriormente translocada os tecidos dreno onde ocorre o descarregamento do floema. A partição desses assimilados é complexa, pois há uma alteração na relação fonte-dreno, após o início da sangria, observando-se uma redução no ritmo de crescimento das plantas, tendo em vista que a partição dos fotoassimilados produzidos nas folhas, em particular a sacarose, antes direcionada para atender apenas a demanda dos diferentes órgãos-drenos naturais da planta, passa a ser fortemente dirigida à reconstituição do látex extraído através da sangria e regeneração da casca tornando-se importantes drenos induzidos durante a fase de produção da cultura (Mesquita et al., 2006; Cairo et al., 2009).

2.3 Metabolismo do nitrogênio

O N, dentre todos os elementos minerais essenciais requeridos pelas plantas, é o que se necessita em maiores quantidades. Esse macronutriente atua

na síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, clorofilas, ácidos nucleicos, coenzimas, além de fitormônios, vitaminas e alcaloides os quais desempenham importantes papéis no metabolismo vegetal. Sua deficiência frequentemente limita o crescimento vegetal, sendo os sintomas a clorose gradual das folhas mais velhas, seguida por abscisão e a redução do crescimento da planta (PALLARDY, 2008; LI; WANG; STEWAR, 2013).

O N está disponível no solo em diversas formas, tais como: NH_4^+ , NO_3^- , aminoácidos, peptídeos solúveis. No entanto, NO_3^- e NH_4^+ são as principais fontes minerais de N absorvidas pelas plantas, sendo que a forma de N inorgânico absorvida depende da espécie e das condições do solo (WILLIAMS; MILLER, 2001). Em condições ideais de pH e oxigênio, a forma nítrica é predominante em consequência do processo de nitrificação no qual bactérias promovem a oxidação do NH_4^+ livre (LI et al., 2013). Já em solos anaeróbicos, com baixo pH, baixa temperatura, ou com acúmulo de compostos fenólicos alelopáticos, os quais inibem o processo de nitrificação, a forma amoniacal pode tornar-se mais abundante (MILLER; CRAMER, 2005).

A quantidade de N absorvida pelas plantas varia em função do seu ciclo de desenvolvimento, da quantidade de raízes, da taxa de absorção por unidade de peso de raiz (moles NO_3^- ou NH_4^+ $\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ raiz), da atividade das enzimas envolvidas no ciclo e da disponibilidade de energia para o processo de assimilação (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

O NO_3^- absorvido pelas plantas pode ser assimilado nas raízes, na parte aérea, ou em ambos os locais (FORDE, 2002), porém inicialmente o NO_3^- precisa ser reduzido a NH_4^+ . Essa redução é catalisada por enzimas em duas etapas: a primeira ocorre no citosol através da enzima redutase do nitrato (RN) que transforma NO_3^- em nitrito (NO_2^-) e a segunda ocorre nos cloroplastos (parte aérea) e plastídios (raízes), através da redutase do nitrito (RNi) que converte NO_2^- a NH_4^+ (LI et al., 2013). O NH_4^+ produzido é, então, assimilado pelas

enzimas glutamina sintetase (GS), que requer ATP na reação que adiciona NH_4^+ ao glutamato (Glu) formando glutamina (Gln), na sequência, a glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase ou glutamato sintase (GOGAT) transfere um N amídico da Gln ao 2-oxoglutarato para formar duas moléculas de Glu (ciclo GS/GOGAT) (LEA; MIFLIN, 2011). Ou, ainda, em uma rota alternativa, a enzima glutamato desidrogenase (GDH) realiza a catálise reversível da aminação 2-oxoglutarato (TERCE-LAFORGUE et al., 2013). Atualmente, já se sabe que essa enzima desempenha um papel pequeno na produção de Glu (FONTAINE et al., 2012), contudo seu envolvimento na assimilação do NH_4^+ em condições ambientais adversas tal como deficiência de O_2 tem sido sugerido (SKOPELITIS et al., 2006). Vale destacar que a via GS/GOGAT é a principal via de assimilação primária de NH_4^+ em plantas superiores.

O NH_4^+ presente nos tecidos vegetais pode derivar da absorção direta, da redução do NO_3^- , da desaminação de compostos nitrogenados, da fotorrespiração (KANT et al., 2007) ou da fixação biológica. O NH_4^+ absorvido é geralmente assimilado nas raízes (FORDE, 2002) fato esse verificado em várias espécies arbóreas (HELDT; PIECHULLA, 2011), a exemplo da seringueira (DELÚ-FILHO et al., 1998; LEMOS et al., 1999). Após a incorporação do N inorgânico a compostos orgânicos, esses poderão ser utilizados no próprio local ou transportados através do xilema para a parte aérea, principalmente na forma de aminoácidos (BLOOM et al., 1992). Porém de acordo com Lemos et al. (1999), essas alterações não foram observadas em seringueira.

Quando NO_3^- e NH_4^+ são disponibilizados às plantas em quantidades iguais, o NH_4^+ é comumente absorvido mais rapidamente do que o NO_3^- (MACDUFF; JACKSON, 1991). Explica-se, em parte, essa preferência pelo NH_4^+ , através da energia extra que a planta gastaria para reduzir o NO_3^- a NH_4^+ antes de sua incorporação em componentes orgânicos (BLOOM et al., 1992).

Embora a assimilação de NH_4^+ seja energeticamente favorável em relação a de NO_3^- , com um gasto de 2 ATPs por molécula de NH_4^+ assimilada, enquanto que o NO_3^- necessita de 12 ATPs (BRITTO et al., 2001), somente um número limitado de espécies apresenta desenvolvimento satisfatório quando o NH_4^+ é a fonte predominante de N. Nesta categoria, se destacam as plantas que vivem em ambientes alagados, onde há formação de NH_4^+ , como é o caso do arroz (BRITTO; KRONZUCKER, 2005). Porém, mesmo em espécies tolerantes, Holldampf; Barker (1993) e Liao et al. (1994) observaram que a exposição ao NH_4^+ em solução nutritiva pode causar sintomas de toxidez. Os sintomas de toxidez mais comumente observados são: redução no crescimento foliar e clorose (GERENDAS et al., 1997), alteração na relação parte aérea/raiz (WANG; BELOW, 1996) e uma possível morte das plantas (GIGON; RORISON, 1972).

A assimilação do N pode ocorrer nas raízes ou na parte aérea, sendo a ocorrência de uma forma ou de outra dependente da espécie vegetal e das condições ambientais. Para assimilação na parte aérea, necessita-se primeiramente do transporte do N para as folhas, o qual ocorre via xilema, embora a redistribuição das folhas para outros órgãos ocorra predominantemente na forma de aminoácidos, via floema (PATE et al., 1981). Ainda de acordo com o autor, essa redistribuição é fundamental para o suprimento dos tecidos que não participam na assimilação de N.

Quando a assimilação do N ocorre nas raízes, aminoácidos são transportados para as folhas maduras via fluxo transpiratório pelo xilema (MARSCHNER et al., 1997). Além de poder ser transportado através da membrana plasmática de certas células, em outras formas tais como peptídeos menores (STEINER et al., 1994), bases purinas e pirimidinas e seus derivados (GILLISSEN et al., 2000). Desse modo, a análise de compostos nitrogenados na seiva do xilema pode indicar como a planta está assimilando e transportando o N

(FISCHER et al., 1998; OH et al., 2008). O N transportado pelo xilema pode não ser exclusivamente de origem radicular, pois as reservas de N podem ser remobilizadas (MORENO; GARCIA-MARTINEZ, 1983). Geralmente, no xilema, são transportados NO_3^- , as amidas (Asn e Gln), aminoácidos ácidos (Glu e Asp) e traços de NH_4^+ .

Sawazaki et al. (1987) relatam que, por exame da seiva do xilema, pode-se obter informações qualitativas e quantitativas acerca da atividade de assimilação da raiz, pelo tipo de composto nitrogenado enviado à parte aérea, uma vez que o fluxo de transporte pelos vasos do xilema é o meio de transportar N das raízes para a parte aérea da planta.

O conhecimento das formas de absorção, assimilação e transporte do N é importante na avaliação do comportamento fisiológico dessa espécie nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas, e em distintas condições ambientais (LEMOS et al., 1999).

Dessa forma, ressalta-se a importância do desenvolvimento de pesquisas no sentido de elucidar a contribuição quantitativa das enzimas RN, GS/GOGAT, GDH dentre outras, durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas, mas a existência de múltiplas isoenzimas, distribuídas em diferentes compartimentos celulares e órgãos, dificultam a compreensão dos processos (SHAN, 2007). Em adição, destaca-se também, a busca do entendimento sobre a produção, interconversão e distribuição dos aminoácidos, e o papel dos mesmos em plantas sob condições ambientais particulares, nas quais diferentes vias metabólicas, a exemplo de degradação de proteínas, desaminação e fotorrespiração, podem ser ativadas e operar conjuntamente ou não, para atender à demanda fisiológica do vegetal.

2.3.1 Assimilação e transporte do N em seringueira

Pelacani, (1993) e Botelho et al. (1998), em trabalhos realizados pelo consórcio UFLA/Cemig, com objetivo de revegetação das áreas às margens da represa de Furnas, estudaram o comportamento fisiológico da seringueira em condições de hipoxia e buscaram correlacionar os fatores baixa disponibilidade de O_2 e bioquímica do nitrogênio. Ambos observaram reduções no crescimento, nas trocas gasosas e na assimilação do N em plantas de seringueira submetidas ao alagamento.

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura sobre a dinâmica do N em plantas de seringueira. Sabe-se que plantas jovens de seringueira absorvem tanto NO_3^- quanto NH_4^+ , apresentando melhor crescimento em solução nutritiva contendo ambos os íons em iguais proporções (LEMOS et al., 1999).

Em muitas plantas arbóreas, a assimilação de N ocorre, principalmente, nas raízes, sendo esse o local preferencial de assimilação em plantas de seringueira, pois nessa espécie, até o momento, foi encontrada atividade da RN nas raízes, mas, não nas folhas (DELÚ-FILHO et al., 1998; LEMOS et al., 1999; ALVES, 2001; SHAN et al., 2012; CARVALHO, 2012). Shan et al. (2012) também detectaram a atividade desta enzima no caule de plântulas de seringueira. Mesmo não sendo detectada atividade da RN nas folhas, provavelmente devido à presença de inibidores ou por compostos presentes no látex, Alves (2001), Diniz (2011) e Carvalho (2012) encontraram NO_3^- e pequenas concentrações de NH_4^+ sendo transportado na seixa do xilema.

Em seringueira, a atividade RN é estimulada por níveis crescentes de NO_3^- , até a concentração de 12 mM (DELÚ-FILHO et al., 1998). Lemos et al. (1999) utilizaram NO_3^- e NH_4^+ em diferentes proporções, e observaram que a atividade RN foi maior quando só foi fornecido o NO_3^- e diminuiu à medida que o NH_4^+ foi adicionado. Alves (2001) sugere que RN é uma enzima pré-existente

nas raízes como uma consequência da mobilização do NO_3^- presente em sementes, pois observou a atividade da RN em plantas de seringueira cultivadas apenas com água.

Em plantas jovens de seringueira, as atividades das enzimas GS/GOGAT e GDH indicam para um sistema assimilatório do N mineral no sistema radicular, enquanto que as atividades detectadas na parte aérea para essas enzimas parecem estar mais relacionadas com a reassimilação do NH_4^+ , provavelmente liberado por reações bioquímicas diversas de desaminação, como a fotorrespiração e o metabolismo da asparagina (LEMOS et al., 1999 1996; SHAN et al., 2012).

Em trabalho realizado com plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4^+ , Lemos et al. (1999) observaram que a atividade da GS foi aumentada quando NO_3^- foi adicionado ao meio de cultivo, sendo maior nas lâminas foliares do que nas raízes. Além disso, os autores verificaram uma alta correlação entre a atividade da RN e da GS nas raízes, sugerindo que a GS radicular depende do NH_4^+ produzido nas raízes após a redução pela RN, o mesmo não ocorre nas lâminas foliares, pois neste sítio os altos valores de atividade da GS indicam a presença de outras fontes de NH_4^+ , por exemplo, o NH_4^+ liberado durante a fotorrespiração (DELÚ-FILHO et al., 1998; LEMOS et al., 1999) e/ou de outras reações que liberam NH_4^+ como o metabolismo da asparagina por meio da ação da asparaginase (LEA et al., 1990).

A fotorrespiração, também chamada de ciclo C2, é o processo na qual a Rubisco atua como oxigenase, catalisando a reação do oxigênio à ribulose-1,5-bifosfato, gerando uma molécula de 3-fosfoglicerato e outra de 2-fosfoglicolato. Essa via metabólica ocorre em três organelas: cloroplastos, peroxissomos e nas mitocôndrias, onde a glicina é convertida em serina, ocorrendo a liberação de uma molécula de CO_2 e outra de NH_4^+ (WINGLER et al., 2000), importante ponto de ligação entre os ciclos do C e N. Em seringueira, o processo

fotorrespiratório parece ter grande relevância, por isso, precisa ser melhor estudado (Carneiro et al., 2015).

Avaliando o transporte de compostos nitrogenados na seiva do xilema, Alves (2001) observou em seringueira que em plantas de 1 ano de idade, a principal forma de N translocado foi Gln, seguido pelo Glu e Asp, enquanto que em plantas com seis meses de idade Arg foi a forma predominante seguida de Gln, Glu, Asn e Asp. De acordo com Diniz (2011), existe interação entre *Hevea* e bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Beijerinckia*. No entanto, não há indícios de bactérias endofíticas associadas à seringueira, porém plantas inoculadas apresentaram ganhos de N que variaram entre 19% e 33%. Além disso, nesse mesmo estudo, a autora relatou que as formas nitrogenadas translocadas na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira são, preferencialmente, aminoácidos, NO_3^- , ureídeos e NH_4^+ , nessa ordem. Sendo que os principais aminoácidos transportados na seiva de seringueiras cultivadas com 8 mM de N foram Gln, Gaba, Asp, Arg, Glu, Ala e Ser. Ainda nesse trabalho, verificou-se que em plantas de seringueira inoculadas com bactérias diazotróficas ocorre um aumento do Gaba, Asp, Glu e Ala, e diminuição no conteúdo de Gln e arginina na seiva do xilema. Carneiro (2014) constatou que os principais aminoácidos transportados na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condições normais de água e O_2 foram: Gaba, Asn + Asp (ASX), Gln + Glu (GLX), Ala, Arg e Ser. Entretanto, a privação de O_2 promoveu aumentos de Ala e Gaba enquanto o déficit de hídrico favoreceu a produção de ASX, GLX e Gaba.

Dessa forma, ressalta-se a importância de novas pesquisas visando melhorar o entendimento sobre a forma aminoacídica transportada, verificando se este padrão de translocação depende da fonte de N fornecida e se ocorre dependência em relação à idade da planta e condições ambientais.

Os estudos encontrados na literatura sobre a absorção, assimilação e transporte de N em seringueira têm sido, na sua quase totalidade, desenvolvidos por pesquisadores da Universidade Federal de Lavras, visando conhecer a ligação entre o metabolismo do N e os eventos fisiológicos que ocorrem nesta espécie. Entretanto, nas pesquisas desenvolvidas por este grupo algumas questões ainda precisam ser esclarecidas, principalmente, as que envolvem a atividade da enzima RN na lâmina foliar, bem como a origem do NH_4^+ disponível para a(s) enzima(s) GS e/ou GDH nas folhas, se provem do processo fotorrespiratório ou não. Para esclarecer essas e outras questões, a utilização da técnica de isótopos estáveis (^{15}N) é essencial.

Em estudos de absorção, transporte e redistribuição de N em plantas, têm-se utilizado ^{15}N como marcador, por permitir acompanhar com precisão a quantidade recuperada de N do fertilizante e a sua movimentação no interior da planta, em outras palavras, permite avaliar com precisão a dinâmica do N no sistema. Além de fornecer informações a respeito da absorção, transporte e redistribuição de N pela planta, a técnica de isótopos estáveis de N ajudará a esclarecer algumas indagações que vêm sendo colocadas em relação ao metabolismo do N em seringueira, como: por que o NO_3^- seria transportado para a parte aérea da planta de seringueira se não há atividade da RN nas lâminas foliares? Se não há atividade da RN nas folhas promovendo a redução do NO_3^- , o que justificaria a alta atividade da GS nas folhas de seringueira? O NH_4^+ seria liberado durante a fotorrespiração ou pelo metabolismo da asparagina?

Esse método pode trazer contribuição significativa para a compreensão do metabolismo primário de N e suas interações com o metabolismo de carbono. Pois consiste da utilização de isótopos estáveis como traçadores e fornece ao organismo em estudo um composto químico no qual a razão isotópica do elemento considerado é diferente da normal. Em seguida, é procurada em que

fração dos produtos sintetizados se encontra aquele elemento com razão isotópica alterada.

Diante do exposto, pode-se verificar que as condições ambientais e o N exercem influência sobre a fisiologia da seringueira, muitas questões ainda precisam ser elucidadas e, por isso, a importância de se conhecer a dinâmica do N na avaliação do comportamento fisiológico dessa espécie nos diferentes estádios de desenvolvimento e também em condições ambientais particulares.

2.4 Alterações metabólicas em plantas com sistema radicular sob deficiência de O₂

O estresse é caracterizado como um desvio significativo das condições ótimas para o desenvolvimento das plantas, em decorrência de fatores bióticos e/ou abióticos que desencadeiam uma perturbação do equilíbrio homeostático, com restrição ou com flutuações altamente imprevisíveis impostas aos padrões metabólicos regulares (LARCHER, 2000).

O alagamento dos solos é um fenômeno comum (SAIRAM et al., 2008; BRANDÃO; SODEK, 2009; LANZA et al., 2013) que afeta cerca de 80 milhões de hectares das terras no mundo (FAO, 1995). Diante do cenário climático atual, que indica a ocorrência de eventos extremos com maior frequência, a escassez ou excesso de água tem sido os estresses ambientais que mais têm afetado a agricultura em todo o mundo (HU; XIONG, 2014).

Nessa situação, o principal efeito para as plantas é a redução e/ou impedimento da troca gasosa entre o sistema radicular e o espaço poroso do solo, em função da baixa taxa de difusão de gases no meio aquoso quando comparada ao solo seco (LANZA et al., 2013). Segundo Armstrong et al. (1994) e Reddy; DeLaune (2008), a taxa de difusão do O₂ é aproximadamente 10⁴ vezes menor na água do que no ar e, por isso, de acordo com Yoshida (1975) a

quantidade de O_2 que se difunde não é suficiente para manter o ambiente aeróbio. Dessa forma, a reduzida disponibilidade de O_2 para as raízes, torna o meio anaeróbico, impossibilitando a respiração do sistema radicular.

É sabido que O_2 é essencial na produção de energia para as vias celulares, e sua presença ou ausência determina a atividade metabólica. Ele atua como acceptor de elétrons na fosforilação oxidativa que gera o ATP para o metabolismo celular. Sendo assim, sem O_2 , há interrupção da respiração mitocondrial por falta de um acceptor de elétron, resultando na redução da produção de ATP de 36 para 2 por mol de glicose metabolizada.

Entende-se então, que os efeitos adversos do alagamento são iniciados pela disponibilidade de O_2 em torno das raízes, que determina condições de anoxia ou hipoxia (DENNIS et al., 2000). Entende-se por normoxia, quando o suprimento de O_2 não limita à fosforilação oxidativa (BRANDÃO, 2005). Posto isso, condições hipóxicas são caracterizadas pela restrição da fosforilação oxidativa, a qual ocorre quando a concentração de O_2 está baixa e a relação ATP/ADP começa a declinar (WATERS et al., 1991). A anoxia acontece quando a produção de ATP pela fosforilação oxidativa é desprezível em relação ao gerado pela glicólise e fermentação (DREW, 1997).

No estado de hipoxia, as concentrações de O_2 são insuficientes para manter a taxa normal de respiração da raiz. Nesse caso, a pressão parcial de O_2 limita a produção de ATP pela mitocôndria, gerando declínio na relação ATP/ADP (DENNIS et al., 2000). Em adição, a hipoxia reduz a condutividade hidráulica; interfere nas aquaporinas diminuindo a absorção de água e nutrientes pela raiz (DELL'AMICO et al., 2001); provoca modificações morfológicas, como formação de aerênquimas (THOMAS, 2004), além de induzir adaptações metabólicas nas plantas (SOUSA; SODEK, 2002; SOUSA).

Destaca-se que condições de hipoxia são mais frequentes na natureza quando comparadas as de anoxia e podem promover efeitos adversos no

desenvolvimento (DREW, 1997). No entanto, em ambas as situações são verificados distúrbios no metabolismo geral das plantas (LARCHER, 2000; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008) e quando severos, podem levar a morte do vegetal (HONG-BO et al., 2008). Sendo assim, o déficit de O_2 tem profundo impacto sobre os sistemas ecológicos e agrícolas, destacando-se como um fator que compromete a produtividade de espécies economicamente importantes (MARTINAZZO et al., 2013).

Os vegetais apresentam diferentes respostas ao excesso de água, podendo tolerar desde horas até dias de estresse (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997). A tolerância das plantas a baixa disponibilidade de O_2 no meio varia entre as espécies, genótipos da mesma espécie, idade das plantas, tempo de submersão e intensidade do estresse, e ainda está diretamente relacionada à eficiência e atividade catalítica das enzimas envolvidas nos metabolismos do carbono e do N (CRAWFORD, 1978). Segundo Miyashita; Good, (2008), plantas submetidas à hipoxia ativam rotas metabólicas alternativas ou adicionais às vias convencionais, entre as quais se destacam a fermentação láctica e alcóolica, alterações na produção e interconversão de aminoácidos a partir do piruvato acumulado, e promoção do metabolismo antioxidante, responsável por eliminar os radicais livres em excesso nas células. Assim, deve ser considerado que essas plantas podem apresentar alterações nos metabolismos do carbono, tanto fotossintético quanto respiratório, do N e antioxidativo.

Quando o sistema radicular se encontra em condições de alagamento, situação na qual a respiração aeróbica praticamente cessa nas raízes, as modificações fisiológicas comumente observadas são redução nas trocas gasosas (KOZLOWSKI, 1997; LIAO; LIN, 2001) e alterações na síntese, transporte e partição de fotoassimilados (PEZESHKI, 2001). A alteração do potencial hídrico foliar somada à diminuição de substrato (CO_2) provocam uma redução da atividade da Rubisco, comprometendo o processo de carboxilação. Então, ao

nível da folha, o declínio da condutância estomática para evitar a perda da água, juntamente com a diminuição da atividade fotossintética constituem uma primeira barreira de defesa contra o estresse (KOZLOWSKI, 1997). Sabendo-se que a fotossíntese representa a fonte de carbono nas plantas superiores, quando prejudicada em situações de estresse, afeta toda a dinâmica do metabolismo do carbono.

Além disso, nessas condições de deficiência de O_2 , a planta, especialmente as raízes, é induzida a uma adaptação bioquímica anaeróbica, buscando manter taxas de metabolismo basal para sustentar sua sobrevivência sob economia de energia (IRFAN et al., 2010). Portanto, sob hipoxia, a sobrevivência da planta depende do metabolismo anaeróbico (ROCHA et al., 2010).

No processo respiratório anaeróbico, em função da ausência ou redução da concentração de O_2 , ocorre a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial, acumulando NADH e $FADH_2$ (SAIRAM et al., 2008). Por conseguinte, há diminuição da atividade enzimática no ciclo de Krebs e acúmulo de seus compostos intermediários, além do decréscimo da disponibilidade de NAD^+ e acúmulo de piruvato (FAN et al., 1997; ROCHA et al., 2010). Com o acúmulo de piruvato e de poder redutor, ocorre aumento do processo de fermentação láctica ou alcoólica que pela redução do piruvato por meio das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase ou lactato desidrogenase produzem etanol e lactado respectivamente (SOUSA; SODEK, 2003). Nesse período de fermentação nas raízes, a produção de ATP cai de 36 para 2 moles por mol de glicose metabolizada (SOUSA; SODEK, 2002).

Entretanto, aliada à respiração anaeróbica, a atividade parcial do ciclo de Krebs, caracterizada pelo funcionamento de partes deste ciclo em sentidos opostos, pode ser uma estratégia importante em condições de hipoxia (FOX et al., 1994). Um caminho segue a partir do oxaloacetato, originado da

transformação do piruvato, até o succinato, no sentido oposto ao habitual, gerando NAD^+ no lugar de NADH . O outro caminho começa em 2-oxoglutarato, porém no sentido normal do ciclo, originando succinil-CoA e, posteriormente formando succinato e ATP (ROCHA et al., 2010).

Assim como o funcionamento parcial do ciclo de Krebs, ramificações a partir do piruvato são acontecimentos extremamente importantes quando se trata do metabolismo do N em hipoxia. Isso porque, sob deficiência de O_2 , ocorrem modificações na composição de aminoácidos na planta principalmente diminuindo as quantidades de Glu, Gln, aspartato (Asp) e asparagina (Asn) e acumulando alanina (Ala) e ácido γ -aminobutírico (Gaba) (SOUSA; SODEK, 2003). De acordo com Rocha et al. (2010), Asp e Glu são gerados pela aminação dos ácidos orgânicos oxaloacetato e 2-oxoglutarato. Sendo esses aminoácidos precursores para a formação de Ala (SOUSA; SODEK, 2003). Um ponto a ser considerado é que tanto a Ala quanto o succinato são atóxicos às células, sendo acumulado nas mesmas e permitindo a manutenção da respiração sob condições hipóxicas (SOUSA; SODEK, 2002; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

O Gaba também pode ser sintetizado a partir do Glu o qual pode derivar de processos proteolíticos, transaminação de outros aminoácidos, reassimilação de NH_4^+ através do ciclo GS/GOGAT ou da redução do NO_3^- (REGGIANI et al., 1988; REGGIANI, 1999; REGGIANI et al., 2000).

Entende-se ainda que a síntese de Ala pode ter como fonte de N a transaminação indireta com Asp, via aspartato aminotransferase (AspAT) ou direta com Glu, através da alanina amino transferase (AlaAT) (SOUSA; SODEK, 2002), sendo que a AlaAT não aceita Asp como doador do grupo amino (SOUSA; SODEK, 2003). Porém, pouco se sabe sobre a importância da formação de Ala sob hipoxia, visto que sua síntese não regenera NAD^+ (SOUSA; SODEK, 2002), embora contribua para a regulação do pH celular (REGGIANI et al, 1988). A síntese do Gaba ocorre pela α -descarboxilação do

Glu, reação catalisada pela glutamato descarboxilase e a função desse aminoácido, sob hipoxia, parece ser também a de regular o pH citosólico (REGGIANI, 1999; SOUSA; SODEK, 2002).

Outra explicação para o acúmulo desses dois aminoácidos em condições de hipoxia, é que os mesmos não causam toxicidade na célula, diferentemente dos produtos da fermentação (DREW, 1997). O acúmulo do Gaba também pode ser devido à sua difícil metabolização, já que a transaminação na qual o Gaba participa é interrompida em condições de hipoxia, uma vez que o pH ótimo para atividade da enzima é de 8,9 (STREETER; THOMPSON, 1972). Em plantas submetidas à deficiência de O₂, a interconversão de aminoácidos ajuda a regular o pH celular (FAN; HIGASHI; LANE, 1988) sendo, portanto, considerada fundamental para a sobrevivência das espécies sob hipoxia (RICARD et al., 1994). Sendo assim, as plantas tolerantes acumulam produtos finais, como aminoácidos e ácidos orgânicos. Esse fenômeno juntamente com outros aspectos metabólicos ajuda no melhor desempenho das plantas sob hipoxia (CRAWFORD, 1972; DREW, 1997).

O N está entre os nutrientes que mais são afetados pelo alagamento do solo (HOLZSCHUH, 2011), logo, estudos das suas formas de absorção, assimilação, transporte e distribuição, bem como a avaliação das enzimas atuantes no metabolismo desse elemento apresentam significativa importância especialmente quando se deseja avaliar comparativamente o desempenho do vegetal em condições particulares como sob baixa disponibilidade de O₂.

Diante disso, trabalhos têm demonstrado que a nutrição com diferentes formas de N (NO₃⁻ e NH₄⁺) podem induzir respostas metabólicas distintas (ESCOBAR et al., 2006; PATTERSON et al., 2010). Foi verificado que NO₃⁻ melhora a tolerância das plantas à hipoxia, pois reduz os danos provocados pelo alagamento (MALAVOLTA, 1954; BRANDÃO; SODEK, 2009; LANZA et al., 2013). Tem sido evidenciado que a redução do NO₃⁻ a NO₂⁻ por meio da enzima

RN pode ocorrer sob a deficiência de O_2 (REGGIANI et al., 1995; BOTREL et al., 1996). Teoricamente, a redução do NO_3^- demanda NADH, promove a regeneração do NAD^+ e reduz a acidificação citosólica (BRANDÃO; SODEK, 2009). No entanto, pesquisas buscam fornecer outras explicações para o efeito benéfico do NO_3^- durante a hipoxia e não são baseadas unicamente no efeito direto do consumo de prótons e regeneração do NAD^+ pela RN (LIBOUREL et al., 2006).

Outra hipótese é que para evitar a diminuição do pH, ocorre a expulsão de H^+ do citosol com o transporte de NO_2^- para fora da célula (SHINGLES et al., 1996). Além disso, existem evidências de que a redução do NO_2^- , produto da redução do NO_3^- , a óxido nítrico (NO) também seja importante na regeneração do NAD^+ . Stoimenova et al. (2007) demonstraram que o NO_2^- pode agir como um acceptor alternativo de elétrons na cadeia respiratória sendo reduzido a NO em um processo acoplado à regeneração do NAD^+ e à síntese de ATP, fato relevante na manutenção da funcionalidade mitocondrial durante a deficiência de O_2 (GUPTA; IGAMBERDIEV, 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Ainda assim, os dados referentes ao metabolismo e aos mecanismos pelos quais os compostos nitrogenados atuam em plantas sob privação de O_2 não estão completamente esclarecidos (SOUSA; SODEK 2002; BAILEY- SERRES; VOESENEK 2008; OLIVEIRA et al., 2013). E apesar de todas essas alterações metabólicas contribuírem para reduzir a tolerância ao alagamento, espécies diferentes mostram grandes variações nas suas respostas (OLIVEIRA et al., 2013).

Além das modificações no metabolismo do carbono e N, a deficiência de O_2 também pode provocar alterações na produção e remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs), por meio da indução do metabolismo antioxidante.

O estresse causado pelo alagamento induz o estresse oxidativo em diversas plantas, e a depender da severidade do estresse pode ocorrer um

aumento considerável na produção das EROs, levando a uma cascata de eventos que se inicia com a peroxidação de lipídeos, avança para degradação de membranas e morte celular (PANDA; KHAN, 2009).

As EROs como o superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete são geradas durante processos metabólicos nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Porém, sob condições adversas o acúmulo desses radicais é potencialmente prejudicial às células da planta, provocando danos em biomoléculas valiosas como o DNA, RNA, proteínas e membranas de organelas e celulares (JALEEL et al., 2009).

O O_2^- e OH^- possuem baixa mobilidade pela membrana celular e curto tempo de meia-vida, o que implica em elevada capacidade de reação e especificidade de sinalização dessas EROs. Além disso, o radical OH^- , que pode ser formado a partir de O_2^- ou H_2O_2 , é o mais reativo, sendo também considerado o iniciador da peroxidação lipídica (SCANDALIOS, 1993). Já o peróxido de hidrogênio possui capacidade de cruzar as membranas celulares e maior tempo de meia-vida, o que possibilita agir como molécula sinalizadora do estresse oxidativo (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

Como uma estratégia de proteção aos danos oxidativos, as plantas têm desenvolvido um complexo sistema de defesa, que é dividido em não enzimático, composto por carotenoides, ascorbato, glutathione e α -tocoferóis. e enzimático, com ação da superóxido dismutase (SOD; 1.15.1.1), que catalisa a transformação do radical superóxido a H_2O_2 ; catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que produz H_2O e O_2 a partir do H_2O_2 ; e enzimas do ciclo ascorbato-glutathione, como a ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) que também elimina o H_2O_2 (BEN AHMED et al., 2009; JALEEL et al., 2009).

A SOD catalisa a dismutação dos íons superóxido, formando H_2O_2 . É a primeira enzima do sistema antioxidante e pode ser vista como protetora contra os danos oxidativos causados pelos radicais O_2^- (SCANDALIOS, 1993;

POMPEU et al., 2008), pois está presente em todos os compartimentos celulares suscetíveis ao estresse oxidativo (BOWLER et al., 1992). O estresse por baixa disponibilidade de O_2 leva a uma maior atividade da SOD, a qual determina a concentração de O_2^- e H_2O_2 , sendo central nos mecanismos de defesa necessários para prevenir a formação de radicais OH^- (JALEEL et al., 2007). A CAT está presente predominantemente nos peroxissomos agindo na eliminação do H_2O_2 proveniente do ciclo fotorrespiratório (FRUGOLI et al., 1996), pode também ser encontrada em outros compartimentos celulares, tem uma baixa afinidade pelo H_2O_2 , sendo ativa somente quando este está em altas concentrações (GECHEV et al., 2006). A APX está presente em cloroplastos e mitocôndrias, ou ainda no citosol e nos peroxissomos, e ao contrário da CAT, têm alta afinidade pelo H_2O_2 , eliminando-o mesmo em baixas concentrações (GECHEV et al., 2006). É a principal enzima do ciclo ascorbato-glutationa, degradando o H_2O_2 e formando H_2O . O ascorbato é utilizado como cofator enzimático, resultando na formação de dehidroascorbato o qual é reciclado a ascorbato, sendo a glutathione reduzida (GSH) a doadora de elétrons. Logo a ação combinada dessas enzimas permite a conversão de radicais O_2^- e de H_2O_2 , prejudiciais à célula, em H_2O e O_2 tornando a eficiência do sistema antioxidante em resposta ao estresse extremamente importante para a tolerância das plantas ao alagamento (ASADA; TAKAHASHI, 1987).

É conhecida também a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) pela alteração do metabolismo mitocondrial. Mitocôndrias sob hipoxia reduzem o NO_2^- a NO , o qual é considerado como molécula sinalizadora do estresse, pois possui propriedades químicas favoráveis para penetrar a bicamada lipídica. Esse composto é facilmente removido das células, podendo reagir com o O_2 , formando NO_2^- , o qual é metabolizado pela RNi (STOHR; STREMLAU, 2006).

De forma geral, na base bioquímica da tolerância à deficiência de O_2 estão envolvidos: a regulação do pH citosólico que evita a acidificação, a manutenção da glicólise para geração de ATP, regenerando NAD^+ a partir do NADH, e a formação de metabólitos e produtos finais diferentes de etanol e lactato, que sejam atóxicos ou facilmente transportados para a solução externa (RICARD et al., 1994; DREW, 1997; SUMMERS, 2000), bem como a ação eficaz do metabolismo antioxidativo (JALEEL et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ALLÈGRE, A. et al. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 408, p. 2625-2634, 2004.

ALVES, E. M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

ARMSTRONG, W. Polarographic oxygen electrodes and their use in plant aeration studies. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences**, Canberra, v. 102, p. 511-527, 1994.

ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advances in botanical research**, New York, p. 697, 1979.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond CJ, Artzen CJ. (Eds). **Photoinhibition: Topics in Photosynthesis**, Amsterdam, p. 227-287, 1987.

AVIGAD, G. Sucrose and other disaccharides. In: ___ **Plant Carbohydrates I**. Heidelberg, v. 13, p. 217-347, 1982.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, 2008.

BAUER, G. A.; BERNTSON, G. M. Ammonium and nitrate acquisition by plants in response to elevated CO₂ concentration: the roles of root physiology and architecture. **Tree Physiology**, Oxford, v. 21, n. 2-3, p. 137-144, 2001.

BEN AHMED, C. et al. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, n. 2, p. 345-352, 2009.

BERNARDES, M. S. et al. Mercado brasileiro de borracha natural. **Sangria da seringueira. Piracicaba: Esalq**, p. 365-388, 2000.

- BLOKHINA, O. et al. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.
- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 5, p. 359-373, 2010.
- BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 99, n. 4, p. 1294-1301, 1992.
- BOTELHO, M. N. et al. Adaptação morfo-anatômica de plantas jovens de *Inga vera* Willd. e *Virola surinamensis* (Rolland. Ex Rottb.) Warb. a submersão. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica**, Curitiba, v. 14, p. 93-107, 1998.
- BOTREL, A.; MAGNE, C.; KAISER, W. M. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Versailles, v. 34, n. 5, p. 645-652, 1996.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M. V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.
- BRANDÃO, A. D.; SODEK, L. Nitrate uptake and metabolism by roots of soybean plants under oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 21, n. 1, p. 13-23, 2009.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- BRITTO, D. T. et al. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 7, p. 4255-4258, 2001.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 1396-1409, 2005.

CAIRO, P. A. R.; OLIVEIRA, L. E. M.; MESQUITA, A. C.; CUNHA, R. L. Atividade da rubisco e das enzimas de síntese e hidrólise de sacarose, associada à produtividade de látex, em clones de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd ex. ADR. de Juss.) Muell.-Arg] cultivados em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**; Lavras, v. 33, n. 2, p. 369-376, 2009.

CARNEIRO, M. M. L. C. **Fisiologia de plantas jovens de seringueira cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas e sob baixa disponibilidade de água e oxigênio**. 108p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CARVALHO, P. A. **Metabolismo do Nitrogênio e Antioxidante em plantas jovens de seringueira (*Hevea* spp) submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio e na presença de nitrato e/ou amônio**. 77 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CEPLAC-COMISSÃO EXECUTIVA DA LAVOURA CACAUEIRA. **Crise no mercado da borracha ameaça a sobrevivência da heveicultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/restrito/lerNoticia.asp?id=2201>> Acesso em: 25 fev. 2015

COPELAND, L. Enzymes of sucrose metabolism. **Methods in Plant Biochemistry**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 73-85, 1990.

COSTA, R. B. et al. Variabilidade genética e seleção para caracteres de crescimento da seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 2, p. 299-305, 2008.

COTTA, M. K. et al. Análise econômica do consórcio seringueira-cacau para geração de certificados de emissões reduzidas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 969-979, 2006.

CRAWFORD, J. S. et al. Binding of bromosulphthalein sodium by human serum albumin using a continuous diafiltration technique. **British Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 80-88, 1972.

CRAWFORD, R. J. et al. Degradation of Feedstuff Nitrogen in the Rumen Nitrogen Solubility in Three Solvents. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 1768-1775, 1978.

DELL'AMICO, J. et al. Differences in the effects of flooding the soil early and late in the photoperiod on the water relations of pot-grown tomato plants. **Plant Science**, Davis, v. 160, n. 3, p. 481-487, 2001.

DELÚ-FILHO, N. et al. Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 3, p. 185-190, 1998.

DENNIS, E. S. et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 342, p. 89-97, 2000.

DENNIS, A. G.; Conrad J. K. Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. **Tree Physiology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 411-417, 1998

DINIZ, P. F. A. **Associação de bactérias diazotróficas na assimilação e transporte de nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea* spp)**. 2011. 253 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ELLIS, R. P. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. **Bothalia**, Pretoria, v. 12, n. 4, p. 641-671, 1979.

ESCOBAR, M. A.; GEISLER, D. A.; RASMUSSEN, A. G. Reorganization of the alternative pathways of the Arabidopsis respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. **The Plant Journal**, Malden, v. 45, n. 5, p. 775-788, 2006.

FAN, T. W. M. et al. Anaerobic nitrate and ammonium metabolism in flood-tolerant rice coleoptiles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 1655-1666, 1997.

FAN, T. W. M.; HIGASHI, R. M.; LANE, A. N. An in vivo ¹H and ³¹P NMR investigation of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 266, n. 2, p. 592-606, 1988.

FAO (1995a). Prevention and disposal of obsolete and unwanted pesticide stocks in Africa and the Near East. Rome, Food and Agriculture Organization <http://www.fao.org/docrep/W8419E/W8419e09.htm#7> [Geo-2-165]

FISCHER, W. N. et al. Amino acid transport in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, n. 5, p. 188-195, 1998.

FONTAINE, J. X. et al. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. **The Plant Cell**, Portland, v. 24, n. 10, p. 4044-4065, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS- **The rubber plantation resource**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/ac126e/ac126e03.htm>> Acesso em 22 jun. 2015

FORDE, B. G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 203-224, 2002.

FOX, T. C.; KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E. Energetics of plant growth under anoxia: metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon*. **Annals of Botany**, London, v. 74, n. 5, p. 445-455, 1994.

FRUGOLI, J. A. et al. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, n. 1, p. 327-336, 1996.

GECHEV, T. S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, Hoboken, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.

GERENDAS, J.; SATTELMACHER, B. Significance of N source (urea vs. $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. giromontiina). In: **Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment**, Netherlands, p. 75-80, 1997.

GIGON, A.; RORISON, I. H. The response of some ecologically distinct plant species to nitrate- and to ammonium-nitrogen. **The Journal of Ecology**, London, p. 93-102, 1972.

GILLISSEN, B. et al. A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Portland, v. 12, n. 2, p. 291-300, 2000.

GONÇALVES, P. de S. et al. Variabilidade genética da produção anual da seringueira: estimativas de parâmetros genéticos e estudo de interação genótipo x ambiente. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 2, p. 305-320, 1990.

GONZÁLEZ, M. C. et al. Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar beet plants. **Planta**, Heidelberg, v. 222, n. 2, p. 386-395, 2005.

GUPTA, K. J.; IGAMBERDIEV, A. U. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 537-543, 2011.

HELDT, H. W.; PIECHULLA, B. In the photorespiratory pathway phosphoglycolate formed by the oxygenase activity of Rubisco is recycled. **Plant Biochemistry**, London, p. 193-209, 2011.

HERNANDES, F. A.; FERES, R. J. F. Review about mites (Acari) of rubber trees (*Hevea* spp., Euphorbiaceae) in Brazil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 0-0, 2006.

HIRSCHE, J. et al. Interspecies compatibility of the anther specific cell wall invertase promoters from *Arabidopsis* and tobacco for generating male sterile plants. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 118, n. 2, p. 235-245, 2009.

HÖLLDAMPF, B.; BARKER, A. V. Effects of ammonium on elemental nutrition of red spruce and indicator plants grown in acid soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 24, n. 15-16, p. 1945-1957, 1993.

HOLZSCHUH, A. et al. Expansion of mass-flowering crops leads to transient pollinator dilution and reduced wild plant pollination. In: **Proceedings. Biological sciences/The Royal Society**, London. v. 278, n. 1723, p. 3444-345, 2011.

HONG-BO, S. et al. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n. 3, p. 215-225, 2008.

HORCHANI, F.; ASCHI-SMITI, S.; BROUQUISSE, R. Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam v. 32, n. 6, p. 1113-1123, 2010.

HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 715-741, 2014.

HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 431-444, 1996.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Programa Seringueira**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/>>. Acesso em: 06 set. 2014.

IRFAN, M. et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, Wien, v. 241, n. 1-4, p. 3-17, 2010.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Production and consumption of natural rubber**. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData.pdf>> Acesso em 27 de dez. 2014.

JALEEL, C. A. et al. Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 205-209, 2007.

JALEEL, C. A. et al. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 427-436, 2009.

KANG, B. H. et al. Miniature1-encoded cell wall invertase is essential for assembly and function of wall-in-growth in the maize endosperm transfer cell. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, n. 3, p. 1366-1376, 2009.

KANT, S.; BI, Y-M.; ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 1499-1509, 2011.

OH, K.; KATO, T.; XU, H. L. Transport of nitrogen assimilation in xylem vessels of green tea plants fed with NH_4^+ -N and NO_3^- -N. **Pedosphere**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 222-226, 2008.

KIRBY, J. et al. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, n.1, p. 335-355, 2009.

- KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.
- KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 1-29, 1997.
- KREUZWIESER, J.; PAPADOPOULOU, E.; RENNENBERG, H. Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 6, n. 3, p. 299-306, 2004.
- KRONZUCKER, H. J. et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 8, p. 335-337, 2001.
- LANZA, L. N. M.; ROSSI, S. C.; SODEK, L. Nitrogen fertilization benefits soybean under flooding conditions. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 2-9, 2013.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.
- LEA, P. J.; ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine. In: MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. **Biochemistry of plants: intermediary nitrogen metabolism: volume 16**. New York: Academic Press, p. 121-159, 1990.
- LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Annual Plant Reviews**, Washington, v.42, p. 1-40, 2011.
- LEMOS, G. B de et al. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 113-118, 1999.
- LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWART, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 118, p. 205-397, 2013.
- LIBOUREL, I. G. L. et al. Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, n. 4, p. 1710-1717, 2006.
- LOEFI, S. M. et al. Orotate leads to a specific increase in uridine nucleotide levels and a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis in discs from growing potato tubers. **Planta**, Heidelberg, v. 209, n. 1, 314-323, 1999.

LUNN, J. E.; FURBANK, R. T. Tansley Review No. 105. **New Phytologist**, Lancaster, v. 143, n. 2, p. 221-237, 1999.

MACDUFF, J. H.; JACKSON, S. B. Growth and preferences for ammonium or nitrate uptake by barley in relation to root temperature. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 521-530, 1991.

MALAVOLTA, E. Studies on the nitrogenous nutrition of rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 29, n. 1, p. 98-99, 1954.

MANIVANNAN, P. et al. Protection of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. plants from salt stress by paclobutrazol. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 315-318, 2008.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E.; HIGASHI, R. M. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, n. 1, p. 11-20, 1997.

MESQUITA, A. C.; OLIVEIRA, L. E. M.; MAZZAFERA, P.; DELÚ-FILHO, N.; Anatomical characteristics and enzymes of the sucrose metabolism and their relationship with latex yield in the rubber tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v.18, p.1-8. 2006.

MIELKE, M. S. et al. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and experimental botany**, Elmsford, v. 50, n. 3, p. 221-231, 2003.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. In: **Root Physiology: from Gene to Function**. Springer Netherlands, p. 1-36, 2005

MIYASHITA, Y.; GOOD, A. G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 667-680, 2008.

MORAES, V. H. F. **Estimulação da produção de látex em seringueiras nativas**. Manaus: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê, 9 p. 1978.

MORENO, J.; GARCÍA-MARTINEZ, J. L. Seasonal variation of nitrogenous compounds in the xylem sap of Citrus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 59, n. 4, p. 669-675, 1983.

OLIVEIRA, H. C.; SALGADO, I.; SODEK, L. Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. **Planta**, Berlin, v. 237, n. 1, p. 255-264, 2013.

OLIVEIRA, L. E. M. et al. Assimilação e transporte de carbono e biossíntese de látex em seringueira. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Ed.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, p. 601-640, 2008.

PALLARDY, S. G. Nitrogen metabolism. In: PALLARDY, S. G. **Physiology of Woody Plants**. 3. ed. San Diego: Elsevier, Chapter 9, p. 233-254, 2008.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under Short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Oxford, v. 195, n. 6, p. 442-454, 2009.

PATE, J.S.; LAYZELL, D. B. Carbon and nitrogen partitioning in the whole plant—a thesis based on empirical modeling. In: **Nitrogen and Carbon Metabolism**, Netherlands, n. 3, p. 94-134, 1981.

PATTERSON, K. et al. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1486-1501, 2010.

PELACANI, C. R. **Estratégias de sobrevivência de espécies herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas à condições de inundação do sistema radicular**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

PEZESHKI, S. R. Wetland plant responses to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 46, n. 3, p. 299-312, 2001.

POMPEU, G. B. et al. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 548-552, 2008.

PROELS, R. K. et al. Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular invertase Lin7 is required for pollen development. **Functional Plant Biology**, Sydney, v. 33, n. 6, p. 547-554, 2006.

QUICK, W. P.; SCHAFFER, A. A. Sucrose metabolism in sources and sinks. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A. A. **Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker, p. 115-156, 1996.

REDDY, K. R.; DELAUNE, R. D. Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications CRC Press. **Boca Raton**, Florida, p. 257-324, 2008.

REGGIANI, R. et al. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. **Amino Acids**, Wien, v. 18, n. 3, p. 207-217, 2000.

REGGIANI, R. Amino acid metabolism under oxygen deficiency. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, p. 171-174, 1999.

REGGIANI, R.; BERTINI, F.; MATTANA, M. Incorporation of nitrate nitrogen into amino acids during the anaerobic germination of rice. **Amino Acids**, Wien, v. 9, n. 4, p. 385-390, 1995.

REGGIANI, R. et al. Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 29, n. 6, p. 981-987, 1988.

RENZ, A.; STITT, M. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. **Planta**, Berlin, v. 190, n. 2, p. 166-175, 1993.

RICARD, B. et al. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, p. 1-1, 1994.

ROCHA, M. et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 3, p. 1501-1513, 2010.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**, Portland, v. 14, n. 1, p. 185-205, 2002.

ROSADO, P. L.; PIRES, M. D. M.; SANTOS, D. F. D. Borracha natural: mercado externo e interno. In: ALVARENGA, A. D. P. et al. (Org.).

Seringueira: aspectos econômicos e sociais e perspectivas para o seu fortalecimento. Viçosa: Editora da UFV, p. 49-72, 2006.

RUAN, Y. L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, n. 26, p. 33-67, 2014.

SAIRAM, R. K. et al. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 401-412, 2008.

SAWAZAKI, H. E.; TEIXEIRA, J. P. F.; MIRANDA, M. Avaliação da atividade da lipoxigenase em linhagens de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 2, p. 371-380, 1987.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.

SECRETARIA DE AGRICULTURA DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. **Silvicultura**. Disponível em: < <http://www.seag.es.gov.br/silvicultura.htm>>. Acesso em: 22 de out. 2014.

SECCO, R. S. A botânica da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. Jussieu) Müll.Arg.). In: Alvarenga, A.P. & Carmo, C.A.F.S. (Eds.). **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, p. 1-24, 2008.

SHAN, A. Y. K. V. et al. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 754-762, 2012.

SKOPELITIS, D. S. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 18, n. 10, p. 2767-2781, 2006.

SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo do Goytacazes, v. 14, n. 2, p. 83-94, 2002.

SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2003.

STEINER, H. Y.; NAIDER, F.; BECKER, J. M. The PTR family: a new group of peptide transporters. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 825-834, 1995.

STOHR, C.; STREMLAU, S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 463-470, 2006.

STOIMENOVA, M. et al. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 2, p. 465-474, 2007.

STREETER, J. G.; THOMPSON, J. F. Anaerobic accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus*, L.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 49, n. 4, p. 572-578, 1972.

STURM, A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, n. 1, p. 1-8, 1999.

SUMMERS, J. E.; RATCLIFFE, R. G.; JACKSON, M. B. Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1413-1422, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p. 2013.

TERCÉ-LAFORGUE, T. et al. Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase: II. Physiological Characterization of Plants Overexpressing the Two Enzyme Subunits Individually or Simultaneously. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 54, n. 10, 2013.

THOMAS, A. L.; SODEK, L. Development of the nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes. v. 17, n. 3, p. 291-297, 2005.

TROUGHT, M. C. T.; DREW, M. C. Alleviation of injury to young wheat plants in anaerobic solution cultures in relation to the supply of nitrate and other inorganic nutrients. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 509-522, 1981.

TUPY, J; PRIMOT, L. Control of carbohydrate metabolism by ethylene in latex vessels of *Hevea brasiliensis* Muel. Arg. in relation to rubber production.

Biologia Plantarum, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 373-383, 1976.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M.B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 1, p. 3-20, 1997.

WANG, X.; BELOW, F. E. Cytokinins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 1, p. 121-126, 1996.

WATERS, I. MORRELL, S.; GREENWAY, H.; COLMER, T. D. Effects of Anoxia on wheat seedlings: II. Influence of O₂ supply prior to anoxia on tolerance to anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 1437, 1991.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.

WINGLER, A. et al. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transaction of the Royal Society**, Elmsford, v.355, n. 1402, p. 1517–1529, 2000.

YOSHIDA, M. et al. A highly stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. Purification, properties, and reconstitution. **Journal of Biological Chemistry**, Beltmore, v. 250, n. 19, p. 7910-7916, 1975.

CAPÍTULO 2 Assimilação e transporte de nitrogênio em plantas de seringueira submetidas à hipoxia durante 21 dias na ausência ou presença de nitrogênio

RESUMO

Neste estudo, avaliaram-se as alterações no metabolismo do N (assimilação enzimática das raízes), bem como o transporte de compostos nitrogenados para a parte aérea em plantas de seringueiras (*Hevea Brasiliensis*), sob deficiência de O₂ e tratadas com nitrato ou amônio. As análises bioquímicas, nas raízes e na seiva xilemática, foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a indução dos tratamentos. Quando expostas à hipoxia, as plantas tratadas com nitrato apresentaram maior atividade da enzima redutase do nitrato (RN) e menor transporte de nitrato na seiva do xilema. As atividades da glutamina sintetase (GS), glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) e glutamato-desidrogenase (GDH), nas plantas sob hipoxia diminuíram significativamente quando comparadas com os respectivos controles, independentemente da fonte nitrogenada. No entanto, sob hipoxia, as plantas tratadas com nitrato apresentaram atividades das enzimas GS, GOGAT e GDH significativamente maior quando comparadas com o tratamento com amônio, de modo que a quantidade de amônio na seiva xilemática foi mais elevada nas plantas tratadas com amônio sob hipoxia. Além disso, constatou-se que Glu e Gln foram os aminoácidos preferencialmente transportados para a parte aérea sob normoxia. Já as plantas sob baixa disponibilidade de O₂, apresentaram quantidades elevadas de Ala e Gaba, sendo que, no tratamento com nitrato os resultados foram superiores ao tratamento com amônio. Portanto, os resultados indicaram que a assimilação do N, a biossíntese e o transporte de aminoácidos foram afetados em plantas submetidas à hipoxia e que nitrato e amônio influenciaram de maneiras diferentes as respostas das plantas à baixa disponibilidade de O₂.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*. Hipoxia. Metabolismo do nitrogênio. Nitrato. Amônio.

ABSTRACT

In this study, we evaluated changes in nitrogen metabolism (root enzymatic assimilation) and the transportation of nitrogen compounds to the shoot of rubber trees (*Hevea Brasiliensis*), treated with nitrate or ammonium and under O₂ deficiency. The experiment was conducted during a period of 21 days, performing biochemical analysis every 7 days (day 7, 14 and 21). When exposed to stress, nitrate cultivated plants showed high nitrate reductase (RN) enzyme efficiency and low nitrate levels in sap xylem. Glutamine synthetase (GS), glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) and glutamate dehydrogenase (GDH) activity, in stressed plants, significantly decreased when compared with control plants, regardless of the nitrogen source. However, under hypoxia, plants treated with nitrate showed high enzymatic (GS, GOGAT and GDH) activity, when compared with ammonium treatment. Therefore, the levels of ammonium in the xylem sap were higher in plants under stress and treated with ammonium. Furthermore, we found that glutamate and glutamine are preferably transported to the shoot under normoxia. The plants under low O₂ availability showed high Gaba and alanine transportation, presenting higher results in the nitrate treatment than in the ammonium treatment. Therefore, the results indicate that hypoxia affected nitrogen assimilation, amino acid biosynthesis and transportation, and that nitrate and ammonium influenced plant responses to stress differently.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Hypoxia. Nitrogen metabolism. Nitrate. Ammonium.

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio (O_2) atua como acceptor final de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial e é essencial para a atividade de diversas enzimas, tendo um papel indispensável no metabolismo e no crescimento das plantas (LICAUSI; PERATA, 2009). No entanto, durante o ciclo de vida, as plantas e particularmente o seu sistema radicular pode ser submetido à condição temporária de deficiência de O_2 (IRFAN et al., 2010). Esta condição ocorre, por exemplo, depois de grandes chuvas ou de irrigação excessiva, transbordo ou cheias de cursos de água, situações em que o solo, em função da sua capacidade de drenagem, pode tornar-se alagado, afetando o fornecimento de O_2 para os tecidos submersos (LICAUSI; PERATA, 2009).

As plantas submetidas à deficiência de O_2 podem apresentar várias modificações bioquímicas, incluindo a diminuição da síntese de ATP pela fosforilação oxidativa e consequentemente estimulando processos de fermentação (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). Além do metabolismo primário do carbono, a assimilação e transporte do N também podem ser alterados em plantas sob hipoxia (ROCHA et al., 2010a). Sob condições normais, o nitrato (NO_3^-) absorvido pelas raízes é reduzido pela ação da redutase do nitrato (RN) a nitrito (NO_2^-), que por sua vez é reduzido a amônio (NH_4^+) pela redutase do nitrito (RNi). NH_4^+ é então incorporado em aminoácidos pelo sistema glutamina-sintetase/glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GS/GOGAT). Gln e Glu são os primeiros a serem sintetizados e em seguida, pela ação de aminotransferases, são produzidos os demais aminoácidos. Os aminoácidos são utilizados na produção de proteínas no próprio local ou transportados para outras células ou para outras partes da planta (LEA, 1999). Em situações de estresse, a exemplo da baixa disponibilidade de O_2 , tem sido

sugerido o possível envolvimento da GDH, na assimilação de NH_4^+ (SKOPELITIS et al., 2006).

Está bem estabelecido que NO_3^- exerce um efeito mais positivo que o NH_4^+ sobre o crescimento e metabolismo de plantas submetidas à hipoxia (HORCHANI et al., 2010). Estudos têm relatado que a aplicação de NO_3^- , aumenta a tolerância de algumas espécies de plantas quando em condições de deficiência de O_2 (ALEGRE et al., 2004; THOMAS e SODEK, 2005; HORCHANI et al., 2010) e comparações entre NO_3^- e NH_4^+ indicam que estas formas de N podem induzir respostas metabólicas distintas sob estresse (ESCOBAR et al., 2006; PATTERSON et al., 2010). Contudo, há dificuldades em fornecer uma explicação convincente para o efeito benéfico da NO_3^- durante hipoxia, baseado unicamente nos seus efeitos diretos como redução do NO_3^- pela RN e consequente regeneração do NAD^+ (LIBOUREL et al., 2006). Os mesmos autores sugerem ainda que o NO_3^- tem efeito na regulação do pH citosólico durante a deficiência de O_2 , e por extrapolação, a tolerância a este estresse pode ser mediada por seus produtos metabólicos NO_2^- e óxido nítrico (NO).

Diferentes trabalhos relatam que a adição de NO_3^- leva a um aumento da produção de NO_2^- e NO pelos tecidos de plantas de algumas espécies de plantas com o sistema radicular alagado (BRANDÃO; SODEK, 2009; OLIVEIRA et al., 2013a). Stoimenova et al. (2007) demonstraram também que o NO_2^- pode atuar como um aceptor alternativo de elétrons na cadeia respiratória, sendo reduzido a NO em um processo acoplado à regeneração do NAD^+ e à síntese de ATP. Desse modo, a síntese de NO_2^- teria um papel relevante na manutenção da funcionalidade mitocondrial durante a deficiência de O_2 (GUPTA; IGAMBERDIEV, 2011).

Plantas cujo sistema radicular é inundado podem sofrer alterações bioquímicas e metabólicas a fim de tolerar a condição hipóxica. A redução do NO_3^- ocorre mesmo sob condições de hipoxia (BOTREL et al., 1996). Além

disso, sob anaerobiose, o sistema GS/GOGAT através da sua participação na síntese do Glu, pode desempenhar um importante papel na produção de aminoácidos livres, especialmente Ala e Gaba (REGGIANI et al., 2000).

Assim, objetivou-se analisar as alterações no metabolismo do N em plantas de seringueira submetidas ao alagamento e tratadas com duas fontes de N (NO_3^- ou NH_4^+). Especificamente, foram avaliadas as mudanças relacionadas com as atividades das enzimas RN, GS, GOGAT e GDH no sistema radicular, e ao transporte de NO_3^- , NH_4^+ e aminoácidos na seiva do xilema.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo das plantas e condições experimentais

As plantas de seringueiras foram obtidas a partir de sementes e cultivadas em casa de vegetação (21° 14' S, 45° 00' W, altitude 918 m). As condições ambientais no interior da casa de vegetação foram: temperatura do ar entre 14 °C (mínima) e 36 °C (máxima) com uma temperatura média de 25 °C, umidade relativa do ar média de 75% e 12 horas de fotoperíodo. Sementes (clone RRIM600) previamente selecionadas por tamanho e peso foram germinadas em vasos (5 L) contendo areia. Oito dias após a germinação, as plantas com características morfológicas semelhantes foram transplantadas para vasos (2 L) contendo 2 L de areia e 1 L de solução nutritiva Bolle-Jones (1957) ½ da força e preparada com 2 mM de NO_3^- e 2 mM de NH_4^+ . Permanecendo assim até a indução dos tratamentos. O volume da solução foi completado diariamente com água destilada e o pH foi ajustado para $5,5 \pm 0,5$ todos os dias. Semanalmente as soluções eram completamente substituídas.

2.2 Tratamentos e coletas

Plantas de 12 meses de idade foram submetidas a seis tratamentos constituídos por solução nutritiva de Bolle-Jones (1957) completa sem adição de N, com 8 mM de N na forma NO_3^- (KNO_3) ou com 8 mM de N na forma de NH_4^+ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e duas condições de disponibilidade de oxigênio, plantas controle: mantidas sob normoxia no sistema radicular com solução nutritiva e aeração constante, e plantas sob hipoxia: com solução nutritiva sem aeração, simulando alagamento do sistema radicular. O material vegetal (raízes e seiva do xilema) foi coletado aos 7, 14 e 21 dias após a indução dos tratamentos. As

coletas foram realizadas simultaneamente para permitir comparações precisas entre o comportamento das enzimas do metabolismo do N (RN, GS, GOGAT e GDH) e o transporte de compostos nitrogenados (aminoácidos, NO_3^- e NH_4^+) na seiva do xilema, ao longo do período experimental.

2.3 Avaliação das enzimas de assimilação do nitrogênio

A atividade da RN (E.C.1. 6. 6. 1) foi avaliada, *in vivo*, como proposto por MEGURO e MAGALHÃES, (1983). As raízes foram fragmentadas em pequenos segmentos, utilizou-se 500 mg de tecido aos quais se adicionaram 5 mL da solução de incubação constituída por tampão fosfato 0,1 M, contendo n-propanol e KNO_3 100 mM. O tecido vegetal, submerso nessa solução, foi infiltrado a vácuo por duas vezes e mantido na ausência de luz, em banho-maria a 30 °C com agitação. Para determinar a quantidade de nitrito formada pela reação, a cada alíquota de 0,5 mL retirada do meio de incubação foi adicionado 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N e 1 mL de N-naftil-etileno-diamino a 0,02%, completando-se o volume final para 4 mL com água destilada. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$.

Para as demais enzimas (GS, GOGAT e GDH), os extratos enzimáticos foram obtidos a partir da maceração de 1 g de raiz em nitrogênio líquido, adicionaram-se 5 mL de tampão de extração contendo tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), PMSF 1 mM, EDTA 100 mM, 10% PVPP e DTT 2 mM. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C.

A atividade da GS (EC 6. 3. 1. 2) foi avaliada como proposto por Ratajczack et al. (1981). O ensaio da GS foi realizado tomando-se uma alíquota de 300 μL do extrato bruto, adicionou-se 700 μL de um meio reacional contendo 200 μL de tampão tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; 100 μL de mercaptoetanol 0,1 M; 50

μL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 M; 150 μL de NH_2OHCl 0,1 M; 100 μL de glutamato monossódico 0,5 M e 100 μL de ATP 0,1 M. Incubou-se a mistura a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma solução composta de FeCl_3 0,37 M, HCl 0,67 M e ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M. Em seguida, centrifugou-se a 16.000 g por 5 minutos e o quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade enzimática expressa em μmol de GHA. $\text{g}^{-1}\text{MF}\cdot\text{min}^{-1}$.

A GOGAT (EC 1. 4. 1. 7) foi determinada em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5, contendo 20 mM de 2-mercaptoetanol, 0,2 mM NADH, 15 mM de 2-oxoglutarato, 15 mM de L-glutamina e 10 mM de KCl (GROAT e VANCE, 1981). A atividade da GDH (EC 1. 4. 1. 3) foi determinada com 100 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,2 mM NADH, 10 mM de 2-oxoglutarato, 4 mM de CaCl_2 e 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (GROAT e VANCE, 1981). Para ambas, GOGAT e GDH, alíquotas de 20 μL foram adicionadas a 180 μL do meio de incubação. A oxidação do NADH foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 340 nm, durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto.

2.4 Determinações de aminoácidos, NO_3^- e NH_4^+

A coleta da seiva xilemática foi realizada por meio da metodologia de Milburn; Ranasinghe (1996) com modificações segundo Diniz (2011). A separação e análise de aminoácidos na seiva foram realizadas por HPLC (High-performance liquid chromatography) de fase reversa usando OPA (o-ftaldialdeído) para derivação dos aminoácidos, tal como descrito por (PUIATTI e SODEK, 1999). NO_3^- e NH_4^+ foram determinados de acordo Cataldo et al. (1975) e McCullough (1967) respectivamente.

2.5 Análises estatísticas e delineamento experimental

O experimento foi arranjado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (3 x 2 x 3). Sendo composto por seis tratamentos e três tempos de coleta (7, 14 e 21 dias) com quatro repetições independentes, totalizando 72 plantas. Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Assimilação de NO_3^- e NH_4^+ nas raízes

A atividade da RN foi detectada apenas em tratamento NO_3^- (Figura 1A). Sendo significativamente maior nas plantas sob hipoxia em comparação com normoxia. Além disso, a atividade desta enzima, nas raízes, aumentou com o tempo de exposição à hipoxia, passando de $0,1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ aos 7 dias para $0,2 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ aos 21 dias (100%). Sob normoxia, a atividade atingiu $0,13 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ aos 21 dias.

Acredita-se que NO_3^- tem um profundo efeito sobre o metabolismo anaeróbico e a sua presença no meio circundante pode aumentar a tolerância das plantas à inundação (KAISER; HUBER, 2001). Uma hipótese de que a “respiração do NO_3^- ” poderia explicar o efeito benéfico desse íon sobre a tolerância ao alagamento, foi proposta, uma vez que a reciclagem de NAD^+ pela redução do NO_3^- substituiria a formação de lactato e etanol (ROBERTS et al., 1985). No presente estudo, a atividade da RN foi detectada apenas no tratamento com NO_3^- , uma vez que esta enzima é induzida pelo substrato. Sua atividade foi maior sob hipoxia do que em normoxia, provavelmente devido a maior disponibilidade de poder redutor no citosol. Além disso, a atividade dessa enzima aumentou acentuadamente durante o período de hipoxia no sistema radicular. Assim, o transporte de NO_3^- na seiva do xilema foi significativamente menor sob hipoxia do que em normoxia para qualquer período de tempo avaliado. Consistente com estes dados, Garcia Novo e Crawford (1973) encontraram aumento na atividade RN (ensaios *in vivo*) em raízes de muitas espécies sob alagamento.

A assimilação redutiva de NO_3^- a NH_4^+ pode ter duas funções em plantas sob deficiência de O_2 , ambos contribuindo para aliviar a acidez citosólica. Em

primeiro lugar, o processo consome 4 moles de NADH, 8 elétrons e 8 prótons por ciclo reacional (SALSAC et al., 1987), sendo mais eficiente na produção de NAD⁺ e no consumo de prótons do que qualquer reação de fermentação (FAN et al., 1997). O processo também gera íons hidroxila (SMIRNOFF; STEWART, 1985), que podem reagir com os prótons gerados por hipoxia. Portanto, a redução de NO₃⁻ é uma via alternativa para dissipar os elétrons podendo reduzir a formação de produtos da fermentação. Evidências recentes também sugerem que o efeito benéfico do NO₃⁻, no metabolismo das plantas em condição de hipoxia, pode envolver seus produtos metabólicos: o NO₂⁻ e o NO (STOIMENOVA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013). Ainda segundo Oliveira et al. (2013), existe uma correlação negativa entre o processo de produção de NO a partir de NO₂⁻ e a intensidade de fermentação nas raízes. No entanto, eles sugerem que um efeito direto de NO₂⁻ na modulação do metabolismo hipóxico não pode ser excluído.

Por outro lado, foi observada uma redução significativa nas atividades das enzimas GS, GOGAT e GDH sob baixa disponibilidade de O₂ quando comparados com os respectivos controles. No entanto, no tratamento com NO₃⁻ ocorreu uma menor influência da hipoxia em comparação com o tratamento com NH₄⁺. Independentemente da disponibilidade de O₂ e do tempo avaliado, o tratamento sem N exibiu baixas atividades destas enzimas quando comparado com os tratamentos com NO₃⁻ e com NH₄⁺. No tratamento com NO₃⁻, após 21 dias sob condições de normoxia ou hipoxia, atividade da GS diminuiu de cerca de 3,5 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ para 3,3 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ e de 2,4 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ para 2,1 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ respectivamente. Já no tratamento com NH₄⁺, a atividade da GS reduziu de 2,2 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ para 1,6 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ em condições de normoxia e de 1,2 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ para 0,7 μmol GHA.g⁻¹ MF.min⁻¹ sob hipoxia, indicando que a deficiência de O₂ afeta a atividade da GS nas raízes (Figura 1B). No entanto,

foi evidente que, no tratamento com NH_4^+ foi observada uma maior redução da atividade da GS quando comparada ao tratamento com NO_3^- .

Consistente com estes resultados, a atividade da GOGAT, nas raízes submetidas à hipoxia durante 21 dias, apresentou uma redução de aproximadamente 50% independentemente da fonte de N em todos os períodos de tempo estudados (Figura 1C), ou seja, verificou-se uma diminuição de $9,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $5,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ no tratamento com NO_3^- e de $4,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $2,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ no tratamento com NH_4^+ . Porém, vale ressaltar que, sob hipoxia, o tratamento com NO_3^- apresentou valores duas vezes mais elevados que o tratamento com NH_4^+ na mesma condição de disponibilidade de O_2 . Sob normoxia, os dados variaram de $12,8 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ a $10,8 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ e de $11,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ a $8,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$, nos tratamentos com NO_3^- e com NH_4^+ respectivamente.

Também foi detectada uma redução na atividade da GDH em raízes mantidas sob hipoxia. No tratamento com NO_3^- , houve um decréscimo de 27%, em média, (de $36 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $26 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$) em comparação com o controle (Figura 1D). Mais uma vez, a maior diminuição ocorreu no tratamento com NH_4^+ , observou-se uma queda de 76%, em média, (de $13 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $3 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$) quando comparou-se normoxia com hipoxia.

As plantas cultivadas com NH_4^+ não necessitam de reduzir o NO_3^- à NO_2^- ou NO_2^- à NH_4^+ . A falta desses processos é prejudicial, especialmente em plantas sob hipoxia, pois equivalentes redutores não são reciclados. Além disso, a primeira reação que ocorre quando o NH_4^+ é absorvido é catalisada pela GS a qual é dependente de ATP, logo, em raízes sob deficiência de O_2 , a atividade desta enzima reduz à proporção que a relação ATP/ADP é reduzida (LIMAMI et al., 2008). Menor atividade da GS pode levar ao acúmulo de NH_4^+ que, em

quantidades elevadas, pode ter efeitos deletérios sobre a célula vegetal (GIVAN, 1979). Os resultados também mostraram uma diminuição na atividade da GS nos tratamentos sob hipoxia, indicando que a deficiência de O_2 afetou a atividade da GS em raízes de seringueira. Além disso, ficou evidente que, no tratamento com NH_4^+ , a redução foi maior em comparação com o tratamento com NO_3^- . Neste estudo, a quantidade mais elevada de NH_4^+ transportada no xilema foi observada no tratamento com NH_4^+ . E independente da fonte de N utilizada, o transporte de NH_4^+ para a parte foi significativamente aumentado após o sistema radicular ter sido submetido à hipoxia. Estes dados, portanto, corroboram com a atividade reduzida da GS durante a hipoxia.

Sabe-se que a GS tem sua atividade diminuída em condições de privação de O_2 , por isso, o envolvimento da GDH na assimilação de NH_4^+ sob condições hipóxicas tem sido sugerido (SKOPELITIS et al., 2006). Neste trabalho, a enzima GDH foi menos afetada pela baixa disponibilidade de O_2 no tratamento com NO_3^- . Isto pode ser devido a menor alteração do pH celular no tratamento com este íon (OLIVEIRA et al., 2013). Sabe-se que a GDH catalisa uma reação reversível, e na direção da formação de Glu, que utiliza o NADH como poder redutor. Possivelmente, sob hipoxia, a reação na direção de formação de Glu seja favorecida. Isto pode ser decorrente da disponibilidade de poder redutor e da diminuição da atividade da GS (REGGIANI et al., 2000).

Neste estudo verificou-se também, as maiores atividades da enzima GOGAT no tratamento NO_3^- . Além disso, sob condição de baixa disponibilidade de O_2 , o tratamento com NO_3^- apresentou resultados duas vezes mais elevados que o tratamento com NH_4^+ . O ciclo GS/GOGAT contribui para a reassimilação de NH_4^+ , assimilação primária do NO_3^- e “ressíntese” constante de Glu para a síntese de outros compostos (REGGIANI et al., 2000).

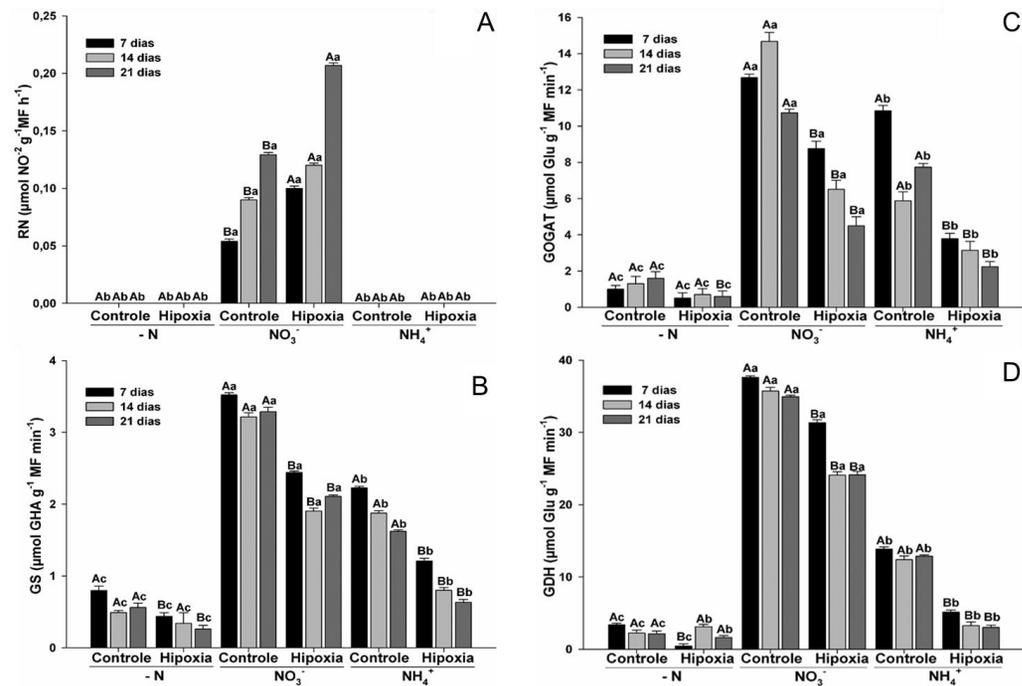


Figura 1 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nas atividades das enzimas redutase do nitrato (A), glutamina sintetase (B), glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (C) e desidrogenase do glutamato (D), nas raízes de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (7, 14 e 21 dias) dentro de cada fonte de nitrogênio (-N, NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

3.2 Compostos nitrogenados transportados na seiva do xilema

Os dados relativos ao transporte de NO_3^- na seiva do xilema são mostrados na Figura 2A. O transporte de NO_3^- foi observado somente no tratamento com NO_3^- . A quantidade de NO_3^- na seiva do xilema foi significativamente menor sob hipoxia do que em condição de normoxia para quaisquer tempos estudados. Sob normoxia, os dados variaram de 3.500 $\text{nmol NO}_3^- \cdot \text{mL}^{-1}$ a 2.800 $\text{nmol NO}_3^- \cdot \text{mL}^{-1}$. Em condição de hipoxia, nas plantas tratadas com NO_3^- , o transporte desse ânion foi reduzido de 2.000 $\text{nmol NO}_3^- \cdot \text{mL}^{-1}$ aos 7 dias, para 1.200 $\text{nmol NO}_3^- \cdot \text{mL}^{-1}$ aos 21 dias. Estes dados estão de acordo com o aumento da atividade da RN durante hipoxia.

A quantidade de NH_4^+ transportada no xilema (Figura 2B) foi muito menor que a quantidade de nitrato na seiva xilemática, e, foi significativamente aumentada após o sistema radicular ser submetido à hipoxia, sendo que as mais altas quantidades foram observadas no tratamento com NH_4^+ . Sob hipoxia, a quantidade de NH_4^+ na seiva variou entre 1,0 nmol.mL^{-1} e 3,5 nmol.mL^{-1} no tratamento com NO_3^- , e entre 18,0 nmol.mL^{-1} e 30,0 nmol.mL^{-1} no tratamento com NH_4^+ . Estes dados são, portanto, consistente com a atividade reduzida da GS durante hipoxia principalmente no tratamento com NH_4^+ . Por outro lado, sob normoxia, os resultados não variaram ao longo do período experimental, ou seja, manteve-se aproximadamente 1,0 nmol.mL^{-1} no tratamento NO_3^- e 14,0 nmol.mL^{-1} no tratamento com NH_4^+ .

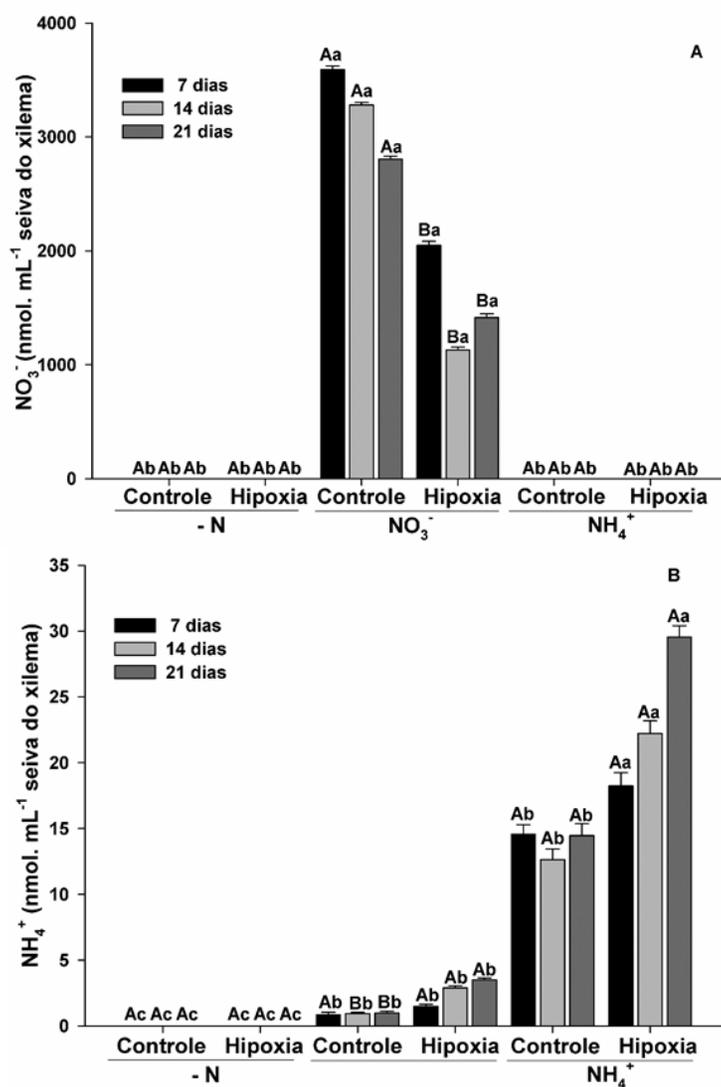


Figura 2 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no transporte de nitrato (A) e de amônio (B), no xilema de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (7, 14 e 21 dias) dentro de cada fonte de nitrogênio (-N, NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Sob condição de normoxia, Glu e Gln foram os aminoácidos transportados em quantidades mais elevadas, independente da fonte de N. Estes dois em conjunto representam aproximadamente 70% do total no tratamento com NO_3^- e 60% no tratamento com NH_4^+ (Tabela 1). Na sequência, no tratamento com NO_3^- são encontrados Ala, Gaba, Asp, Arg, Val, Gly, Ser e Thr, que em conjunto totalizaram 27% e os outros representaram 3,0%. No tratamento com NH_4^+ , após Gln e Glu, a ordem encontrada foi: Gaba, Arg, Ala, Asp, Val, Ser, Thr e Gly (38%) e os outros representaram 2,0%.

Entre os aminoácidos que foram produzidos em anaerobiose, Ala e Gaba destacaram-se, representando juntos 92% no tratamento com NO_3^- e 50% no tratamento com NH_4^+ . Além do mais, no tratamento com NO_3^- o total de aminoácidos na seiva aumentou acentuadamente em condições de hipoxia (Tabela 2), quando comparado com normoxia (Tabela 1).

A maioria dos estudos realizados com raízes de plantas submetidas à deficiência de O_2 revela aumentos na interconversão e nas quantidades de aminoácidos livres (STREETER; THOMPSON, 1972a; FAN et al., 1997; REGGIANI et al., 2000). De acordo com os resultados do presente estudo, entre os aminoácidos que se acumulam em anaerobiose, Ala e Gaba destacaram-se. Independente da fonte de N, a análise global do teor de aminoácidos na seiva do xilema indica que a hipoxia levou ao redirecionamento do metabolismo de aminoácidos, particularmente no sentido de síntese dos aminoácidos Ala e Gaba. Além disso, o tratamento com NO_3^- diferenciou-se estatisticamente e superou o tratamento com NH_4^+ . Concomitantemente, sob hipoxia, foi detectada uma redução no transporte de Asp e Glu já que estes aminoácidos atuam como precursores para a síntese de Ala e Gaba.

Tabela 1 Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de normoxia, NO₃⁻ (8 mM), NH₄⁺ (8 mM) ou (0 mM) de nitrogênio (-N) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 21 dias. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 7, 14 e 21 dias após a indução do tratamento.

	Normoxia											
	- N				NO ₃ ⁻				NH ₄ ⁺			
	7dias	14dias	21dias	média	7dias	14dias	21dias	média	7dias	14dias	21dias	média
Glu	45.6	31.5	15.3	30.8	12.5	39.7*	62.3*	38.2*	19.4	27.5	31.1*	26.0
Gln	1.4	17.6	1.3	6.8	47.5*	38.9*	0.6	29.0*	27.3*	30.0*	33.7*	30.3*
Gaba	1.5	7.1	5.2	4.6	3.4*	5.4	8.8*	5.9	10.3*	16.2*	14.2*	13.5*
Ala	2.6	3.9	8.1	4.9	3.2	7.6*	10.1	7.0	5.9	6.8	7.5	6.7
Asp	9.0	14.6	0.8	8.1	10.6	0.9	2.3	4.6	9.5	1.2	0.3	3.7
Gly	0.3	1.7	6.4	2.8	0.8*	0.1	2.9	1.3	0.9*	0.7	0.6	0.7
Ser	0.5	3.1	0.2	1.2	2.3*	0.2	0.4	0.9	3.2*	0.2	0.2	1.2
Arg	0.1	1.6	1.6	1.1	7.7*	1.1	2.1	3.6*	11.4*	7.3*	4.4*	7.7*
Val	0.7	1.9	0.3	0.9	2.2	2.4	1.6*	2.1	1.9	2.7	3.7*	2.7
Thr	0.6	2.0	8.4	3.7	1.0	0.1	2.8	1.3	1.1	0.8	0.5	0.8
Outros	1.3	3.6	0.5	1.8	6.2*	0.7	3.8*	3.6*	3.3	1.5	0.8	1.9
Total	63.6	88.6	48.1	66.7	97.4	97.1	97.7	97.5	94.2	94.9	97.0	95.2

Legenda: * Representa diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando comparado com o tratamento livre de nitrogênio (-N). De acordo com a análise de uma via ANOVA seguido pelo teste de Scott Knott. Outros incluem: asparagina, histidina, leucina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina e tirosina.

Tabela 2 Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de hipoxia NO_3^- (8 mM), NH_4^+ (8 mM) ou (0 mM) de nitrogênio (-N) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 21 dias. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 7, 14 e 21 dias após a indução do tratamento

	Hipoxia											
	- N				NO_3^-				NH_4^+			
	7dias	14dias	21dias	média	7dias	14dias	21dias	média	7dias	14dias	21dias	média
Glu	26.8	38.0	42.4	35.7	26.8	4.6	9.0	13.5	8.6	11.8	30.4	16.9
Gln	4.9	12.5	0.1	5.8	1.1	4.3	0.7	2.0	8.4	9.0	5.4*	7.6
Gaba	10.5	4.7	11.5	8.9	41.2*	76.4*	63.5*	60.4*	28.8*	32.9*	35.4*	32.4*
Ala	3.7	5.1	0.4	3.1	24.2*	32.4*	15.8*	24.1*	20.1*	0.7	2.1*	7.6*
Asp	16.1	12.1	7.4	11.9	0.6	0.6	1.2	0.8	2.4	0.5	0.1	1
Gly	0.2	1.7	2.7	1.5	1.2*	4.0*	7.4	4.2*	1.1*	0.7	0.1	0.6
Ser	4.0	0.8	0.1	1.6	0.2	0.1	0.4	0.2	4.3	0.3	0.1	1.6
Arg	0.4	0.8	0.1	0.4	1.0*	0.4	1.1*	0.8	7.4*	6.4*	9.7*	7.8*
Val	1.4	1.6	0.0	1.0	1.4	0.1	0.2	0.5	1.9	2.3	1.5*	1.9
Thr	0.2	0.9	3.0	1.3	1.4*	4.3*	9.3*	5.0*	1.1*	0.8	0.3	0.7
Outros	4.3	3.6	0.2	2.7	1.7	0.3	1.3*	1.1	5.8	2.3	0.3	2.8
Total	72.5	81.8	67.9	73.9	100.8	127.5	109.9	112.6	89.9	67.7	85.4	80.9

Legenda: * Representa diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando comparado com o tratamento livre de nitrogênio (-N). De acordo com a análise de uma via ANOVA seguido pelo teste de Scott Knott. Outros incluem: asparagina, histidina, leucina, lisina, isoleucina, fenilalanina, metionina e tirosina.

Independente da fonte de N, a análise dos aminoácidos transportados na seiva do xilema indicou que a hipoxia levou ao redirecionamento do metabolismo de aminoácidos, particularmente no sentido de síntese de Ala e Gaba (Figura 3). Além disso, nos tratamentos com NO_3^- e com NH_4^+ foram detectadas reduções nas quantidades de Glu, Gln e Asp.

Acredita-se que a transaminação, indiretamente com Asp, via aspartato aminotransferase (VANLERBERGHE et al., 1991) e diretamente com Glu (REGGIANI et al., 1988), através da alanina aminotransferase, são os mecanismos responsáveis pelo fornecimento de N para Ala (GOOD; CROSBY, 1989b). Vanlerberghe et al. (1991) sugeriram que a acumulação de Ala é diretamente dependente da assimilação anaeróbica de NH_4^+ e relaciona-se com o metabolismo fermentativo para determinar o "*status*" de N na planta. Assim, a síntese de Ala permitiria desintoxicação de NH_4^+ sem afetar o estado de energia ou o potencial redox da célula e esse aminoácido pode ser utilizado na síntese de outros aminoácidos. Como bem evidenciado pelos resultados desse trabalho, a produção de Ala foi mais favorecida pela fonte nítrica. O acúmulo de Ala não é tóxico para a célula, sendo uma propriedade importante para a tolerância à hipoxia. De fato, tem sido sugerido que a Ala atua como uma forma não-tóxica de armazenamento de carbono e N durante hipoxia, uma vez que é capaz de formar piruvato e de participar na síntese de outros aminoácidos por transaminação (SOUSA; SODEK, 2003; ROCHA et al., 2010b; SHINGAKI-WELLS et al., 2011).

Outro aminoácido que se acumula sob várias condições de estresse incluindo a deficiência de O_2 é o Gaba (REGGIANI et al., 2000). A sua síntese ocorre principalmente pela descarboxilação do Glu, em uma reação catalisada pela glutamato descarboxilase (CRAWFORD et al., 1994). Esta enzima possui atividade ótima em pH ácido (SNEDDEN et al., 1992), logo, o aumento da síntese do Gaba pode ser explicado pelo efeito de redução do pH citosólico sob

deficiência de O_2 . Além disso, foi proposto um papel da rotatividade do Gaba na tolerância à deficiência de O_2 , uma vez que o seu catabolismo contribui para a regeneração do NAD^+ em condições de hipoxia (BREITKREUZ et al., 2003), enquanto que a síntese do Gaba através do glutamato descarboxilase consome H^+ , compensando assim os efeitos prejudiciais da acidificação citosólica durante a hipoxia (CRAWFORD et al., 1994).

A maioria dos autores concorda que a interconversão dos aminoácidos promove a regulação do pH celular em órgãos de plantas sob deficiência de O_2 (STREETER; THOMPSON, 1972a; CRAWFORD et al., 1994; FAN et al., 1997; REGGIANI, 1999), uma característica considerada de fundamental importância para a sobrevivência das espécies vegetais em condições de hipoxia (RICARD et al., 1994).

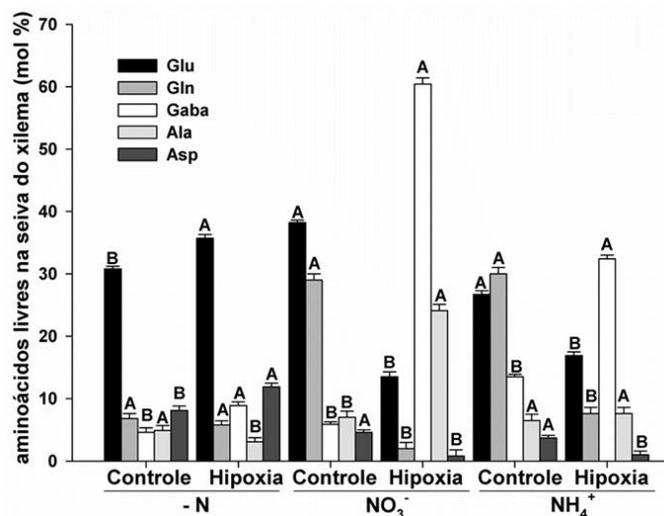


Figura 3 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos no xilema de plantas de seringueira

Legenda: As letras comparam controle e hipoxia dentro de cada fonte de nitrogênio ($-N$, NO_3^- e NH_4^+). Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

4 CONCLUSÃO

A assimilação do N, a biossíntese e o transporte de aminoácidos, em plantas de seringueira, são alterados sob hipoxia. Nitrato e amônio influenciaram de maneiras diferentes as respostas das plantas à baixa disponibilidade de O₂.

Apenas as plantas cultivadas com NO₃⁻ apresentaram atividade da RN, sendo que o alagamento promoveu aumento na atividade dessa enzima e reduziu o transporte de nitrato na seiva do xilema.

Independentemente da fonte nitrogenada as atividades da GS, GOGAT e GDH, diminuíram nas plantas sob hipoxia, por outro lado o transporte de NH₄⁺ na seiva aumentou.

Nos tratamentos com NO₃⁻ ou com NH₄⁺, Glu e Gln foram os aminoácidos preferencialmente transportados na seiva do xilema das plantas sob normoxia. Já as plantas sob baixa disponibilidade de O₂ apresentaram maiores quantidades de Ala e Gaba.

Para avaliar a dinâmica do nitrogênio torna-se importante a realização de análises em menores intervalos de tempo.

REFERÊNCIAS

- ALLÈGRE, A. et al. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 408, p. 2625-2634, 2004.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, 2008.
- BOLLE-JONES, E. W. Copper: Its effects on the growth and composition of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 160-178, 1957.
- BOTREL, A.; MAGNE, C.; KAISER, W. M. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Versailles, v. 34, n. 5, p. 645-652, 1996.
- BRANDÃO, A. D.; SODEK, L. Nitrate uptake and metabolism by roots of soybean plants under oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo do Goytacazes, v. 21, n. 1, p. 13-23, 2009.
- BREITKREUZ, K. E. et al. A Novel γ -Hydroxybutyrate Dehydrogenase identification and expression of an arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency. **Journal of Biological Chemistry**, Belmont, v. 278, n. 42, p. 41552-41556, 2003.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- CRAWFORD, L. A. et al. The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 3, p. 865-871, 1994.
- ESCOBAR, M. A.; GEISLER, D. A.; RASMUSSEN, A. G. Reorganization of the alternative pathways of the Arabidopsis respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. **The Plant Journal**, Malden, v. 45, n. 5, p. 775-788, 2006.

FAN, T. W. M. et al. Anaerobic nitrate and ammonium metabolism in flood-tolerant rice coleoptiles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 1655-1666, 1997.

GARCIA-NOVO, F.; CRAWFORD, R. M. M. Soil aeration, nitrate reduction and flooding tolerance in higher plants. **The New Phytologist**, London, v. 72, n. 5, p. 1031-1039, 1973.

GIVAN, C. V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 375-382, 1979.

GROAT, R. G.; VANCE, C. P. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Developmental patterns and response to applied nitrogen. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 67, n. 6, p. 1198-1203, 1981.

GUPTA, K. J.; IGAMBERDIEV, A. U. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 537-543, 2011.

HORCHANI, F.; ASCHI-SMITI, S.; BROUQUISSE, R. Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam v. 32, n. 6, p. 1113-1123, 2010.

IRFAN, M. et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, Wien, v. 241, n. 1-4, p. 3-17, 2010.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 52, n. 363, p. 1981-1989, 2001.

LEA, P. J.; IRELAND, R. J. Nitrogen metabolism in higher plants. **Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-47, 1999.

LIBOUREL, I. G. L. et al. Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, n. 4, p. 1710-1717, 2006.

LIMAMI, A. M. et al. Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 2325-2335, 2008.

LICAUSI, F.; PERATA, P. Low oxygen signaling and tolerance in plants. **Advances in Botanical Research**, London, v. 50, p. 139-198, 2009.

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.

MEGURO, N. E.; MAGALHÃES, A. C. Water stress affecting nitrate reduction and leaf diffusive resistance in *Coffea arabica* L. cultivars. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 58, p. 147-152, 1983.

OLIVEIRA, H. C.; SALGADO, I.; SODEK, L. Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. **Planta**, Berlin, v. 237, n. 1, p. 255-264, 2013.

PATTERSON, K. et al. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. **Plant, cell and environment**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1486-1501, 2010.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, n. 10, p. 767-773, 1999.

RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 51, n. 3, p. 277-280, 1981.

REGGIANI, R. Amino acid metabolism under oxygen deficiency. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, p. 171-174, 1999.

REGGIANI, R. et al. Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 29, n. 6, p. 981-987, 1988.

REGGIANI, R. et al. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. **Amino acids**, Wien, v. 18, n. 3, p. 207-217, 2000.

RICARD, B. et al. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, p. 1-1, 1994.

ROBERTS, J. K. M.; ANDRADE, F. H.; ANDERSON, I. C. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 77, n. 2, p. 492-494, 1985.

ROCHA, M. et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 3, p. 1501-1513, 2010a

ROCHA, M. et al. Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. **Amino Acids**, Wien, v. 39, n. 4, p. 1043-1053, 2010b

SALSAC, L. et al. Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 25, n. 6, p. 805-812, 1987.

SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2003.

SHINGAKI-WELLS, R. N. et al. Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel metabolic adaptations in amino acid metabolism for tissue tolerance. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 156, n. 4, p. 1706-1724, 2011.

SKOPELITIS, D. S. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 18, n. 10, p. 2767-2781, 2006.

SMIRNOFF, N.; STEWART, G. R. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 64, n. 2, p. 133-140, 1985.

SNEDDEN, W. A. et al. Proton/L-glutamate symport and the regulation of intracellular pH in isolated mesophyll cells. **Plant physiology**, Lancaster, v. 99, n. 2, p. 665-671, 1992.

STOIMENOVA, M. et al. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 2, p. 465-474, 2007.

STREETER, J. G.; THOMPSON, J. F. Anaerobic accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus*, L.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 49, n. 4, p. 572-578, 1972.

THOMAS, A. L.; SODEK, L. Development of the nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 17, n. 3, p. 291-297, 2005.

VANLERBERGHE, G. C.; TURPIN, D. H. Anaerobic Metabolism in the N-Limited Green Alga *Selenastrum minutum* II. Assimilation of Ammonium by Anaerobic Cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 94, n. 3, p. 1124-1130, 1990.

VANLERBERGHE, G. C.; JOY, K. W.; TURPIN, D. H. Anaerobic Metabolism in the N-Limited Green Alga *Selenastrum minutum* III. Alanine Is the Product of Anaerobic Ammonium Assimilation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 95, n. 2, p. 655-658, 1991.

CAPÍTULO 3 Assimilação, transporte e distribuição de compostos nitrogenados em plantas de seringueira submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio durante 72 horas na presença de nitrato ou amônio

RESUMO

Neste trabalho, foi avaliado o efeito do alagamento na assimilação, transporte e particionamento dos compostos nitrogenados, em plantas de seringueira com o sistema radicular sob privação de O_2 , e com adição de NO_3^- ou NH_4^+ . Estudou-se as alterações nas raízes, folhas e seiva do xilema. Além disso, verificou-se como o NO_3^- e o NH_4^+ influenciam nas respostas bioquímicas das plantas à anaerobiose. As análises bioquímicas foram realizadas às 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos. Os dados indicaram que, nas raízes, o alagamento reduziu os teores de nitrato e N total assim como a atividade do sistema GS/GOGAT. Por outro lado, elevou as atividades da RN e GDH e as quantidades de NH_4^+ e aminoácidos totais. Enquanto que na seiva xilemática a hipoxia favoreceu o transporte de NH_4^+ e afetou negativamente o transporte de nitrato. Em relação aos aminoácidos individuais, a composição tanto na raiz quanto na seiva foi alterada principalmente em relação ao aumento de Ala a partir do consumo de Asp e Glu. Nas folhas, a condição hipóxica promoveu a queda nos teores de nitrato e aminoácidos totais, o oposto ocorreu com o teor de NH_4^+ , atividades da GS/GOGAT, GDH e concentrações de Ser, Gly e Ala. Desse modo, constatou-se que existiram alterações no metabolismo do N em condição de hipoxia, assim como, verificou-se que NO_3^- e NH_4^+ influenciaram de maneiras diferentes as respostas das plantas à baixa disponibilidade de O_2 , sendo que, a comparação entre as fontes nitrogenadas permite sugerir que o metabolismo de nitrato induz respostas mais favoráveis, atenuando os efeitos da hipoxia.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*. Alagamento. Metabolismo do nitrogênio. Nitrato. Amônio. Aminoácidos.

ABSTRACT

In this study, we investigated the effect of flooding over the assimilation, transportation and partitioning of nitrogen compounds in rubber tree plants, with root system under oxygen privation, and with the addition of nitrate or ammonium. Special attention was given to the changes occurring on the roots, and on sap and leaves. Furthermore, we verified the influence of nitrate and ammonium over the biochemical responses of plants under hypoxia. The experiment was conducted over a period of 3 days, performing biochemical analyzes at 12, 24, 48 and 72 hours after treatment induction. The data indicated that, for the roots, flooding reduced nitrate and total nitrogen quantities as well as GS/GOGAT system activity. On the other hand, GDH and RN catalysis, as well as ammonium and total amino acids amounts increased. For the xylem sap, stress favored ammonium and reduced nitrate transportation. The composition of amino acids in the root as well as in the sap changed with the increase of alanine from aspartate and glutamate intake. Finally, for the leaves under hypoxia conditions, we observed decreased nitrate and total amino acids quantities. The opposite occurred with ammonium content, GS/GOGAT and GDG activities, and serine, glycine and alanine concentrations. Nitrate and ammonium influenced plant responses to stress in different ways. Therefore there are changes in nitrogen metabolism under hypoxic condition, and the comparison between the nitrogen sources suggest that nitrate metabolism induces more satisfactory responses while minimizing stress effects.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Flooding. Nitrogen metabolism. Nitrate. Ammonium. Amino acids.

1 INTRODUÇÃO

O alagamento do solo é um estresse abiótico que ocorre em grandes áreas do mundo. Embora variável em período e frequência, ele modifica a dinâmica dos nutrientes em ecossistemas, e a absorção e metabolismo dos diversos elementos minerais (GLAZEBROOK; ROBERTSON, 1999). Em áreas de cultivo, o excesso de água geralmente leva a perdas na produtividade (SCHAFFER et al., 2006). Porém, muitas espécies toleram em maior ou menor grau esse estresse, uma vez que desenvolveram adaptações para se manterem sob condições anaeróbicas (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). Estas adaptações incluem mecanismos associados com uma ampla variedade de respostas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (COLMER; VOESENEK, 2009).

A ameaça a sobrevivência da planta resultante do excesso de água, pelo menos para as espécies menos adaptadas, é um suprimento inadequado de O_2 aos tecidos submersos; uma vez que a difusão do O_2 na água é 100.000 vezes mais lento do que no ar (ARMSTRONG; DREW, 2002). Muitos trabalhos tratam direta ou indiretamente do impacto da deficiência de O_2 em condições de alagamento, pois, sendo o O_2 o aceptor final na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, sua deficiência reduz drasticamente a eficiência da produção de ATP, que tem diversas consequências para o metabolismo celular e para os processos de desenvolvimento (SETTER; WATERS, 2003; BAILEY-SERRES; CHANG, 2005). Deste modo, a tolerância à privação de O_2 depende da célula vegetal e tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, genótipo e espécie, bem como da intensidade e duração do estresse (FUKAO et al., 2003). Assim, as respostas à privação de O_2 são altamente variáveis (PEETERS, et al., 2002) e adaptações a longos períodos de submersão são frequentemente associadas com alterações no desenvolvimento tais como: a formação de aerênquimas, de raízes

adventícias e alteração na morfologia e porosidade da raiz. Nesse caso, considerando a raiz um órgão vital que absorve água e nutrientes e ainda funciona como espaço de assimilação e síntese (TABUCHI; MATSUMOTO, 2001), quando sua função é afetada diante de condições ambientais adversas, como por exemplo sob inundação, a planta como um todo é influenciada (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2005).

As respostas celulares iniciais à diminuição da disponibilidade de O_2 ainda são amplamente discutidas e abrangem muito mais do que a simples promoção do metabolismo glicolítico e fermentativo. Há evidências que a privação de O_2 gera perturbações em várias vias simultaneamente, afetando diretamente os processos fotossintético, respiratório e o metabolismo do N (FAN et al., 1988). Uma vez que, sob hipoxia ocorre a diminuição do pH citosólico que passa de neutro em condições de normoxia, para ácido (DAVIES et al., 1986). A acidez está associada não apenas à produção de lactato, mas também ao excesso de equivalentes redutores, queda na atividade das ATPases, hidrólise do ATP e extravasamento de prótons do vacúolo (DREW, 1997; KATONOGUCHI, 2000) ou ainda, acúmulo de CO_2 proveniente da descarboxilação do piruvato (ROBERTS et al., 1992). Estudos demonstram que a acidificação do citosol em plantas deficientes em O_2 é expressivamente diminuída diante da redução assimilatória do NO_3^- a NH_4^+ , pois o processo consome 8 elétrons e 9 prótons por ciclo de reação, sendo mais eficiente na geração de NAD^+ e consumo de H^+ que a fermentação (REGGIANI et al., 1985b). Além disso, para Fan et al. (1997) a passagem do NO_3^- para NH_4^+ contribui para aumentar a carga energética porque favorece a atividade das ATPases. Em tecidos anaeróbicos, ressalta-se ainda a importância da produção e interconversão de aminoácidos evitando o acúmulo de piruvato e dando origem ao alfa-cetoglutarato (REGGIANI, 2000) que participa da operação parcial do ciclo de Krebs formando succinato e conseqüentemente um ATP a nível de substrato (ROCHA

et al., 2010). No entanto, ainda são necessárias pesquisas com ênfase em adaptações metabólicas buscando apresentar uma visão integrada dos processos diante do fenômeno de anaerobiose.

Destaca-se também que apesar da importância do metabolismo N para determinar importantes características fisiológicas e agronômicas (IGLESIAS et al., 2007), há ainda para muitas espécies, uma falta de informações sobre a influência do alagamento na sua absorção, assimilação, transporte e distribuição bem como a respeito da interferência das diferentes formas inorgânicas desse nutriente nas respostas dos vegetais ao déficit de O_2 (Oliveira et al., 2013). Neste trabalho, foram analisados os efeitos da hipoxia na assimilação, transporte e particionamento dos compostos nitrogenados, dando ênfase para as alterações nas raízes, seivas e folhas. Verificou-se também como o NO_3^- e o NH_4^+ influenciam nas respostas bioquímicas das plantas à anaerobiose.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo das plantas e condições experimentais

Plantas de seringueira foram obtidas a partir de sementes e cultivadas em casa de vegetação (21 ° 14' S, 45 ° 00' W, altitude 918 m). As condições ambientais no interior da casa de vegetação foram: temperatura entre 18 °C (mínima) e 40 °C (máxima) resultando em uma temperatura média de 29 °C; média de umidade relativa do ar de 56% e cerca de 12 horas de fotoperíodo. Sementes do clone GT1, previamente selecionadas por tamanho e peso, foram germinadas em canteiros com areia. Quinze dias após a germinação, as plantas de características morfológicas semelhantes foram selecionadas e transplantadas para vasos contendo 5 L de areia e irrigadas com solução nutritiva de Bolle-Jones, (1957) ½ da força e preparada com 2 mM de NO_3^- e 2 mM de NH_4^+ até indução dos tratamentos. O volume e o pH das soluções foram monitorados diariamente, sendo o volume completado e o pH ajustado para $5,5 \pm 0,5$ quando necessário. Em intervalos semanais, as soluções eram completamente substituídas.

2.2 Tratamentos e coletas

Quando as plantas atingiram seis meses de idade, elas foram agrupadas em quatro tratamentos, sendo constituídos de solução completa de Bolle-Jones (1957) com 8 mM de N na forma de $\text{NO}_3^-/\text{KNO}_3$, ou 8 mM de N na forma de $\text{NH}_4^+ / (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e duas condições de disponibilidade de O_2 , controle: plantas mantidas sob normoxia no sistema radicular com solução nutritiva e aeração constante, e hipoxia: plantas em solução nutritiva sem aeração, simulando alagamento do sistema radicular. Ambos os sais nitrogenados utilizados eram

enriquecidos com 10% de marcação isotópica para futuras análises de rastreamento isotópico de compostos nitrogenados. As coletas dos materiais vegetais, folhas e raízes para as análises químicas, foram realizadas às 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

2.3 Características avaliadas

Nos tecidos de folhas e de raízes determinaram-se N total, aminoácidos livres totais, NO_3^- , NH_4^+ , RN, GS, GOGAT, GDH, e a composição de aminoácidos. Enquanto que na seiva do xilema foram analisados NO_3^- , NH_4^+ e aminoácidos individuais.

2.3.1 Coleta da seiva do xilema

O exsudato de xilema foi obtido por meio da metodologia de Milburn; Ranasinghe (1996) com modificações segundo Diniz (2011).

2.4 Enzimas de assimilação do N

Para a realização dos ensaios da RN, GS, GOGAT e GDH os extratos enzimáticos foram obtidos a partir da maceração de 1 g de tecidos (folhas e raízes) em nitrogênio líquido, adicionaram-se 5 mL de tampão de extração contendo tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), PMSF 1 mM, EDTA 100 mM, 10% PVPP e DTT 2 mM. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

A atividade da RN (E.C.1.6.6.1) foi quantificada utilizando protocolo descrito por Berger; Harrison (1995) com algumas modificações. Alíquotas de 20 μL do extrato foram adicionadas ao meio de reação constituído por tampão

fosfato 0,1 M, pH 7,5, β -NADH 0,2 mM e KNO_3 10 mM, perfazendo um volume final de 200 μL . A reação foi iniciada pela adição de NADH, após a incubação do meio, por 3 minutos, a 30 °C. A oxidação do NADH foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 340 nm, durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto e a quantificação foi feita a partir dos 5 minutos de decaimento.

A GS (EC 6. 3. 1. 2) foi avaliada como proposto por Ratajczack et al. (1981). O ensaio da GS foi realizado tomando-se uma alíquota de 300 μL do extrato bruto, adicionou-se 700 μL de um meio reacional contendo 200 μL de tampão tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; 100 μL de mercaptoetanol 0,1 M; 50 μL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 M; 150 μL de NH_2OHCl 0,1 M; 100 μL de glutamato monossódico 0,5 M e 100 μL de ATP 0,1 M. Incubou-se a mistura a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma solução composta de FeCl_3 0,37 M, HCl 0,67 M e ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M. Em seguida, centrifugou-se a 16.000 g por 5 minutos, o quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade enzimática expressa em μmol de GHA. $\text{g}^{-1}\text{MF}\cdot\text{min}^{-1}$.

A GOGAT (EC 1. 4. 1. 7) foi ensaiada em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5, contendo 20 mM de 2-mercaptoetanol, 0,2 mM NADH, 15 mM de 2-oxoglutarato, 15 mM de L-glutamina, 10 mM de KCl (GROAT; VANCE, 1981).

A atividade da GDH (EC 1. 4. 1. 3) foi determinada com 100 mM Tris-HCl, pH 7,80, 0,2 mM NADH, 10 mM de 2-oxoglutarato, 4 mM de CaCl_2 e 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (GROAT; VANCE, 1981). Para ambas, GOGAT e GDH, alíquotas de 20 μL foram adicionadas a 180 μL do meio de incubação e a oxidação do NADH foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 340 nm durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto e a quantificação foi feita a partir dos 5 minutos de decaimento.

2.5 Determinação de N total, aminoácidos livres totais, NO_3^- e NH_4^+

O N total foi obtido a partir do material vegetal seco conforme método de Kjeldahl (AOAC, 1998).

A concentração de aminoácidos livres foi determinada conforme método de Yemm; Cocking (1955) e o padrão utilizado foi glicina.

As concentrações de NO_3^- e de NH_4^+ foram determinadas de acordo com Cataldo et al. (1975) e McCullough (1967) respectivamente.

2.6 Separação e análise da composição dos aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência

Para as folhas e raízes foram pesados 500 mg de tecido vegetal e colocados em tubos de ensaio. Acrescentaram 10 mL de HCl 6 N, e levou-se ao ultrassom por 5 minutos. Em seguida, retirou-se o ar do tubo injetando nitrogênio gasoso por 30 segundos, colocou-se as tampas rosqueáveis nos tubos os quais foram deixados em bloco digestor a 110 °C, por um período de 24 horas. Após a retirada do bloco, completou-se o volume para 50 mL, com água Milli-Q e as amostras filtradas (filtro Whatman nº 1). Já para a seiva do xilema, foi utilizado 1 mL da amostra, completou-se o volume para 10 mL com água Milli-Q. Após essas etapas, tanto para folha e raízes quanto para seiva ajustou-se o pH, entre 2,2 e 2,5 e tomou-se 1 mL da amostra em seringa descartável, filtrando-a em unidade filtrante Millex membrana 0,22 μm .

A separação e análise de aminoácidos foram efetuadas por HPLC em coluna de fase reversa, após derivação com *o*-ftaldialdeído (OPA) (Marur et al., 1994). O aparelho de HPLC utilizado é constituído de três bombas: A, B e C controladas por um gerador de gradiente.

Os solventes utilizados foram: para bomba A: adicionaram-se 18,1 g de citrato de sódio di-hidratado sal trissódico, 16,6 mL de ácido perclórico 60% e 70 mL de etanol, o pH foi ajustado para 3,25. Bomba B: 58,8 g de citrato de sódio di-hidratado sal trissódico, 12,4 g de ácido bórico, e 30 mL de hidróxido de sódio 0,2 N e o pH foi ajustado para 10,0. Bomba C: hidróxido de sódio 0,2 N.

As soluções pós-coluna foram preparadas da seguinte forma: 1) solução de reação: dissolveram-se os reagentes na seguinte sequência: 40,70 g de carbonato de sódio, 18,80 g de sulfato de potássio, 13,57 g de ácido bórico, 400 mg de OPA e 500 mg de N-Acetyl-cysteina. 2) Solução de hipoclorito de sódio: dissolveu-se os reagentes na seguinte sequência: 40,70 g de carbonato de sódio, 18,80 g de sulfato de potássio, 13,57 g de ácido bórico e 0,2 mL de solução de hipoclorito de sódio.

Todas as soluções foram preparadas com reagentes P.A e água Milli-Q para um volume final de 1 L e em seguida, foram filtradas a vácuo em filtro Millipore com 0,45 μm de diâmetro.

Condições Analíticas do Analisador de Aminoácidos: fixou-se a taxa de fluxo a 0,6 mL.min⁻¹ e a temperatura do forno para 60 °C.

Uma alíquota de 20 μL de amostra foi injetada na câmara de injeção de amostra do HPLC. Nesse momento, foi iniciada a eluição através da coluna cromatográfica Shim-pack Amino-Na/Coluna Trap de Amônio Shim-pack IS C - 30 Na com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Ao passar pela coluna cromatográfica, os derivados aminoácidos-OPA foram detectados por um monitor de fluorescência ajustado com λ de excitação de 350 nm e λ de emissão de 450 nm. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área integrada dos picos, comparada aos picos do padrão Sigma de aminoácidos proteicos (Asp, Pro, Glu, Ser, Gly, Thr, Ala, Gln, Met, Val, Leu, Lys, Cys, Arg, Try e Asn).

2.7 Análises estatísticas e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2 x 4. Sendo os quatro tratamentos compostos por duas fontes de N (nitrato ou amônio) e duas condições de O₂ (controle ou hipoxia). Foram realizadas quatro coletas (12, 24, 48 e 72h) com quatro repetições totalizando 64 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Assimilação do NO_3^- e NH_4^+ nas raízes

A atividade da RN foi detectada apenas no tratamento com NO_3^- (Figura 1A) e foi significativamente maior nas plantas sob hipoxia em comparação com normoxia. Além disso, a atividade desta enzima, nas raízes, aumentou com o tempo de exposição à hipoxia, passando de $0,2 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ às 12 horas para $0,34 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ às 72 horas. Em relação ao controle, o aumento médio foi de 4,5 vezes (0,06 para 0,27).

As plantas podem desenvolver mecanismos adaptativos visando atenuar as consequências da privação de O_2 durante o alagamento. Em plantas de seringueira, o metabolismo do N foi afetado pelo tratamento hipóxico. Verificou-se efeitos diferentes dependendo da fonte nitrogenada aplicada a essas plantas nesta condição, sendo alterados tanto a assimilação quanto a concentração, o transporte e a redistribuição dos metabólitos.

Os resultados das atividades enzimáticas e dos compostos nitrogenados nos tecidos da raiz mostraram alterações no metabolismo de N em condição de hipoxia. A RN, GDH e os teores de aminoácidos e de NH_4^+ aumentaram, enquanto que NO_3^- , GS, GOGAT e N total diminuíram.

Trabalhos sobre RN e hipoxia mostram um aumento da atividade dessa enzima em raízes sob déficit de O_2 (BOTREL; KAISER, 1997; ALLÈGRE et al., 2004). A RN é ativada em meio ácido (BOTREL et al., 1996; STOIMENOVA et al., 2003; ALLÈGRE, 2004). E, essa enzima é regulada através de mecanismos transcricionais e pós-traducionais em respostas a diversas condições ambientais incluindo suprimento de NO_3^- , luz, pH, temperatura e disponibilidade de O_2 (HUBER; HUBER, 1996). Em anaerobiose, ocorre o favorecimento da atividade da RN (BOTREL; KAISER, 1997;

STOIMENOVA et al., 2003). Com o aumento na atividade da RN sob hipoxia ocorreu uma significativa queda no teor de NO_3^- nas raízes e no transporte desse ânion no xilema das plantas sob tal condição.

A queda no pH do citosol pode ser considerada responsável pelos danos ocorridos nas plantas sob baixa disponibilidade de O_2 (RICARD et al., 1994). O efeito benéfico do NO_3^- na tolerância dessas plantas envolve aspectos como: reduzir a fermentação (REGGIANI et al., 1985; FAN et al., 1988) e expulsar H^+ da célula via NO_2^- , pois em um transporte do tipo simporte, o NO_2^- e H^+ podem ser direcionados para fora das células (LANZA et al., 2013). Durante a hipoxia, a redução do NO_3^- funciona como um dreno alternativo de elétrons, assim substituindo, em parte, a transformação de piruvato em etanol e lactato e regenerando NAD^+ (FAN et al., 1997). Além disso, trabalhos demonstram uma reação secundária da RN que leva à produção de NO a partir do NO_2^- (OLIVEIRA et al., 2013). Já que, em condições de hipoxia, a menor atividade da RNi comparada com a RN leva ao acúmulo de NO_2^- favorecendo a produção de NO (ROCKEL et al., 2002; JASID et al., 2006). Essa transformação de parte do NO_2^- em NO, um sinalizador, é considerada importante sob estresses como o hipóxico (ROCHA et al., 2010). Stoimenova et al. (2007) demonstraram também que o NO_2^- pode agir como um acceptor alternativo de elétrons na cadeia respiratória sendo reduzido a NO em um processo acoplado à regeneração do NAD^+ e à síntese de ATP, fato relevante na manutenção da funcionalidade mitocondrial durante a deficiência de O_2 (GUPTA; IGAMBERDIEV, 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Ainda segundo Oliveira et al. (2013), existe uma correlação negativa entre o processo de produção de NO a partir de NO_2^- e a intensidade de fermentação nas raízes.

Foram observadas reduções significativas nas atividades das enzimas GS e GOGAT sob baixa disponibilidade de O_2 quando comparadas aos seus respectivos controles. No entanto, para ambas, no tratamento com NO_3^- ocorreu

uma menor influência da hipoxia, logo, foi evidenciada uma maior redução das atividades no tratamento com NH_4^+ .

A atividade da GS diminuiu de $1,6 \mu\text{mol GHA.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $1,2 \mu\text{mol GHA.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ (25%) e de $2,0 \mu\text{mol GHA.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $0,9 \mu\text{mol GHA.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ (55%) diante da aplicação de NO_3^- e NH_4^+ respectivamente (Figura 1B). Em concordância com estes resultados, a atividade da GOGAT, em raízes submetidas à hipoxia, apresentou reduções de aproximadamente 30% e 50% (Figura 1C), ou seja, verificou-se uma diminuição de $3,2 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $2,2 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ no tratamento com NO_3^- $\mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ e de $3,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $1,5 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ com NH_4^+ .

Em contrapartida, foi detectada uma elevação na atividade da GDH em raízes mantidas sob hipoxia. No tratamento com NO_3^- houve um acréscimo de 70%, em média, (de $8,5 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $14,5$) em comparação com o controle (Figura 1D). Dessa vez, a resposta mais representativa ocorreu no tratamento com NH_4^+ , no qual observou-se um aumento de 127%, em média, (de $11,0 \mu\text{mol Glu.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$ para $25,0$) na comparação entre normoxia e hipoxia.

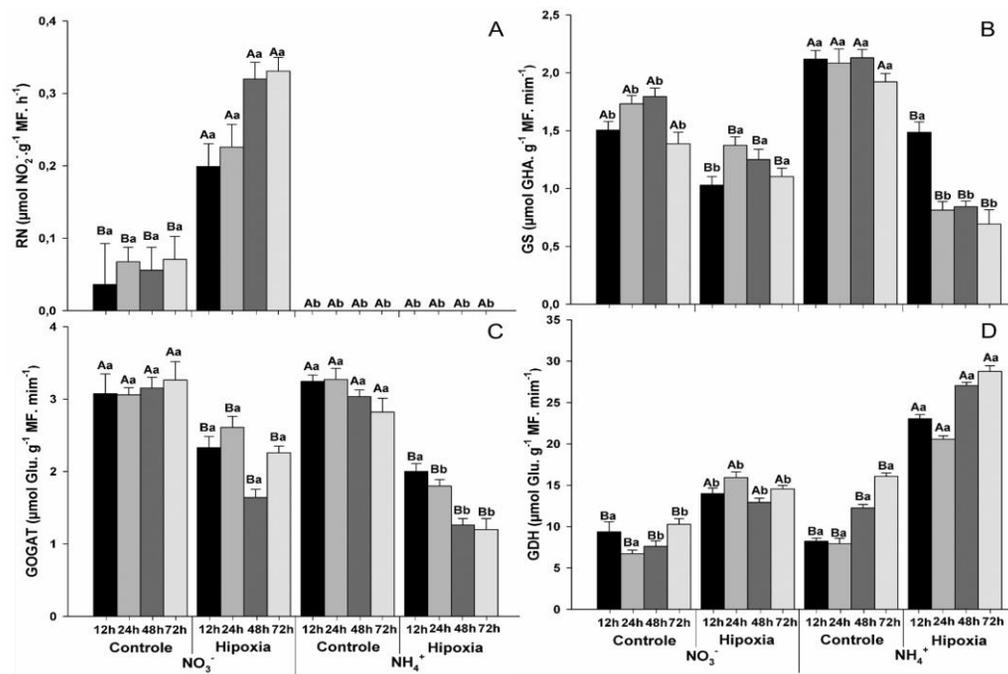


Figura 1 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nas atividades das enzimas redutase do nitrato (A), glutamina sintetase (B), glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (C) e desidrogenase do glutamato (D), nas raízes de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Os ensaios enzimáticos mostraram que as atividades da GS e da GOGAT são afetadas durante alagamento do sistema radicular. De acordo com Limami et al. (2008), as atividades dessas enzimas reduzem à proporção que a relação ATP/ADP é reduzida. Sob hipoxia, a maior atividade do ciclo GS/GOGAT foi encontrada no tratamento com NO_3^- indicando que as reações de redução do NO_3^- e do NO_2^- favoreceram a produção de ATP para utilização pela GS. Participando do ciclo com a GS, a GOGAT contribui para a reassimilação de NH_4^+ , assimilação primária a partir do NO_3^- e biossíntese de Glu para a produção de outros compostos (REGGIANI et al., 2000). Neste trabalho, sob hipoxia, a GDH apresentou significativo aumento em relação ao controle. Sob condições de déficit de O_2 , o envolvimento da GDH na assimilação de NH_4^+ tem sido sugerido (SKOPELITIS et al., 2006), pois quando na direção de formação do Glu, recicla o NADH.

3.2 Teores de NO_3^- , NH_4^+ , N total e aminoácidos livres totais nas raízes

Os resultados dos teores de NO_3^- nas raízes durante os tratamentos de normoxia e hipoxia estão apresentados na Figura 2A. Nas plantas sob normoxia, praticamente não houve variação no teor de NO_3^- entre os períodos avaliados independente da fonte de nitrogênio. Porém, entre as fontes ocorreu diferença significativa sendo que o valor foi em média $15,0 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ com aplicação de NO_3^- e $3,0 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ com NH_4^+ . No caso das plantas submetidas à hipoxia, apenas nas tratadas com NO_3^- , houve redução significativa nos teores NO_3^- (queda de 50% em relação ao controle).

De acordo com a Figura 2B, os teores de NH_4^+ presente no sistema radicular variaram significativamente entre os diferentes tratamentos. A quantidade de NH_4^+ foi significativamente aumentada após o sistema radicular ser submetido ao baixo O_2 , sendo os maiores teores observados nos tratamentos

com NH_4^+ . Sob normoxia os dados variaram entre 0,45 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ e 0,95 no tratamento com NO_3^- , e entre 3,0 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ e 3,9 no tratamento com NH_4^+ . Por outro lado, sob hipoxia, a oscilação entre a primeira e a última avaliação foi de 2,0 para 3,8 e de 6,0 para 4,0 nos tratamentos NO_3^- e com NH_4^+ respectivamente. Para o teor de N nas raízes, não foram observadas diferenças quando as fontes foram comparadas na mesma condição de O_2 , contudo, entre normoxia e hipoxia os valores não foram semelhantes. Com a falta de O_2 , houve redução de 2,5% para aproximadamente 2,0 em ambos os tratamentos nitrogenados (Figura 3A).

Observou-se (Figura 3B) que houve aumento significativo na concentração de aminoácidos livres totais nas raízes submetidas à hipoxia passando de 1,2 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ para 2,7 nas plantas com NO_3^- e de 1,3 para 2,0 com NH_4^+ .

Em relação ao teor NO_3^- neste trabalho, houve redução na quantidade desse íon nas raízes sob hipoxia, porém o teor de aminoácidos apresentou comportamento oposto, além dos aminoácidos serem produtos da assimilação do NO_3^- possivelmente pode estar ocorrendo a degradação de algumas proteínas e mobilização de reservas evidenciadas pela redução do N total nas raízes. Esse aumento dos aminoácidos pode ser ainda mais complexo para interpretar, pois outra fonte importante é o transporte da parte aérea via floema, ou seja, a chamada redistribuição de aminoácidos pela planta (PATE et al., 1981). De fato, a queda no teor de aminoácidos nas folhas de plantas sob hipoxia, pode evidenciar uma mobilização de compostos nitrogenados da parte aérea para as raízes. Ainda nesse aspecto, vale destacar que o teor de aminoácidos nas raízes sob hipoxia foi maior na presença do NO_3^- do que na presença de NH_4^+ indicando que assimilação de NO_3^- favorece a formação de produtos nitrogenados nessa condição de O_2 . Outra hipótese sugerida para o acúmulo de metabólitos nas raízes é que isso ocorre para diminuir o potencial osmótico e,

consequentemente, o potencial hídrico, favorecendo a absorção de água para manter a turgescência celular (FAN et al., 1997) e compensar a menor absorção de íons, ocasionada pela baixa disponibilidade de ATP (DREW, 1997).

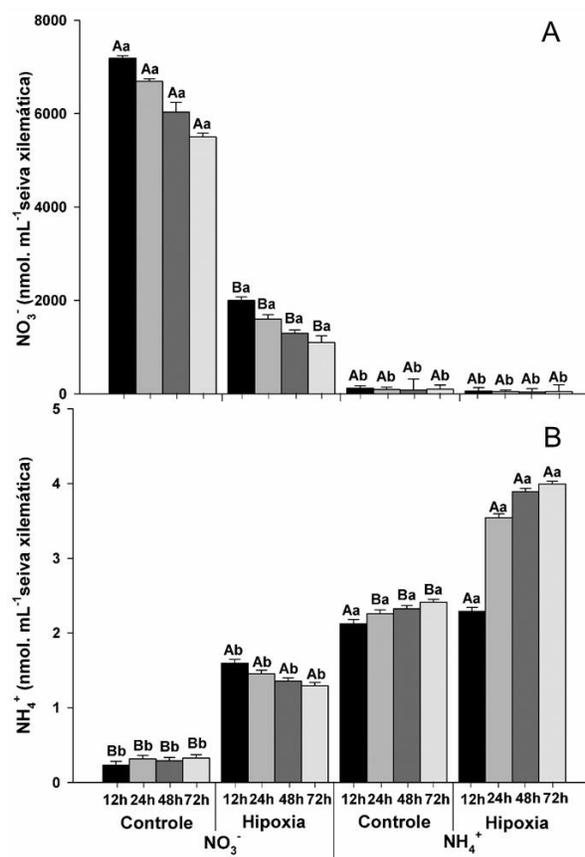


Figura 2 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrato (A), e de amônio (B), nas raízes de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

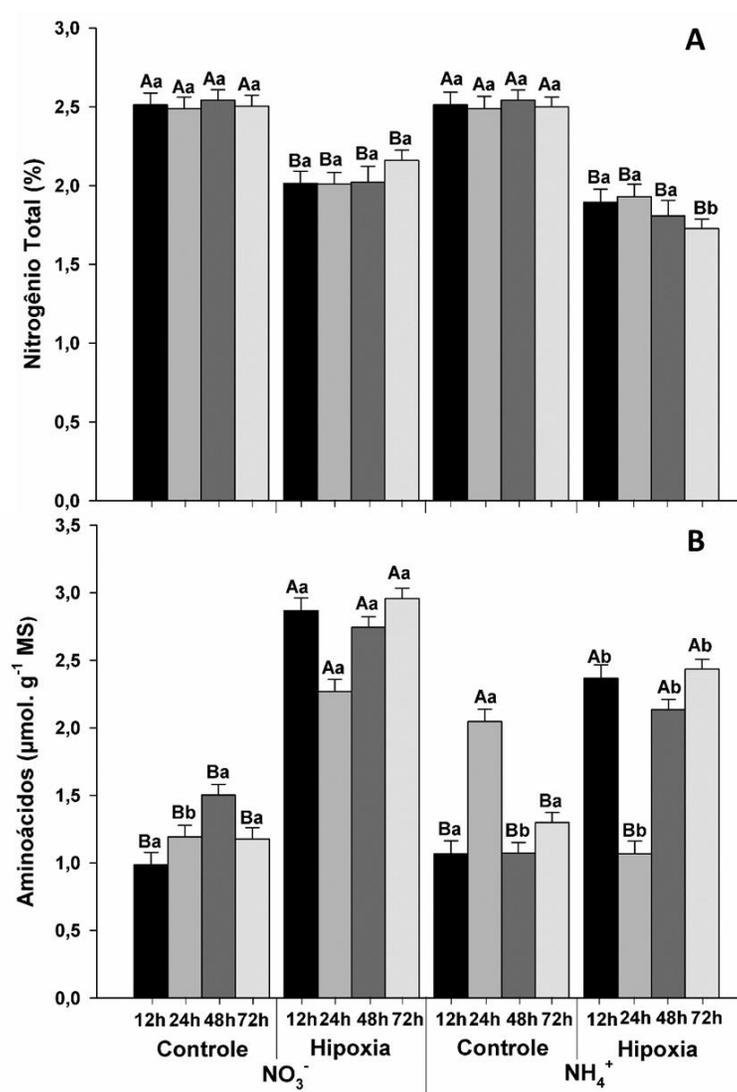


Figura 3 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrogênio total (A), e aminoácidos livres totais (B), nas raízes de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

3.3 Composição de aminoácidos nas raízes

Nas raízes das plantas controle, os aminoácidos constitutivos mais representativos foram Gln, Asn e Pro (Tabela 1). Estes três aminoácidos juntos perfizeram aproximadamente 45% da composição de aminoácidos. Enquanto que sob hipoxia, o aminoácido Ala destacou-se, dobrando sua participação na composição dos aminoácidos das raízes (Tabela 2). Por outro lado, Asn, Glu e Asp reduziram diante do tratamento hipóxico (Tabelas 1 e 2). Esses comportamentos foram observados com a aplicação tanto de NO_3^- quanto de NH_4^+ .

Tabela 1 Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas raízes de plantas de seringueira sob condição de normoxia

Mol%	Normoxia									
	NO ₃ ⁻					NH ₄ ⁺				
	12h	24h	48h	72h	Média	12h	24h	48h	72h	Média
Gln	21,8	13,9	14,9	13,5	16,0	26,1	23,7	23,1	22,2	23,8
Asn	8,8	11,5	10,7	12,0	10,8	22,3	18,1	16,6	14,9	18,0
Pro	8,7	10,3	10,4	12,0	10,4	11,2	12,0	12,8	12,7	12,2
Lys	8,0	8,6	8,6	9,4	8,6	10,4	9,2	9,3	9,7	9,6
Val	7,4	8,5	7,0	9,3	8,1	10,0	8,4	9,2	9,6	9,3
Ala	7,1	7,2	6,7	8,0	7,2	8,1	8,2	8,6	8,6	8,4
Ser	5,9	6,4	6,0	7,0	6,3	4,0	5,8	4,9	6,5	5,3
Leu	5,9	5,5	5,9	6,3	5,9	2,4	4,2	4,3	4,1	3,7
Gly	5,0	5,3	5,9	4,9	5,3	1,6	3,9	4,2	4,1	3,4
Thr	4,9	4,7	4,7	3,2	4,4	1,3	2,1	2,2	2,3	2,0
Cys	4,3	3,0	4,1	2,7	3,5	0,9	1,6	1,8	1,9	1,6
Phe	3,6	2,6	3,7	2,2	3,0	0,7	1,0	1,1	1,2	1,0
Arg	3,1	2,5	3,3	2,1	2,8	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4
Try	2,9	2,0	2,8	1,5	2,3	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6
Glu	1,6	1,8	2,1	3,3	2,2	0,3	1,1	1,0	0,9	0,8
Asp	1,7	0,6	1,5	1,7	1,4	0,3	0,3	0,8	0,8	0,6

Nota: NO₃⁻ (8 mM) ou NH₄⁺ (8 mM) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 72 horas. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

Tem sido sugerido que a Ala e Gaba podem atuar como formas não tóxicas de armazenamento de carbono e N durante hipoxia, uma vez que podem formar piruvato e participar na síntese de outros aminoácidos por transaminação (SHINGAKI-WELLS et al., 2011). A maioria dos autores concorda que a interconversão dos aminoácidos auxilia na regulação do pH celular em órgãos de plantas sob deficiência de O₂ (STREETER; THOMPSON, 1972a; CRAWFORD et al., 1994; FAN et al., 1997; REGGIANI, 2000), uma característica considerada fundamental para a tolerância das espécies vegetais em condições de hipoxia (RICARD et al., 1994).

Tabela 2 Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas raízes de plantas de seringueira sob condição de hipoxia

Mol%	Hipoxia									
	NO ₃ ⁻					NH ₄ ⁺				
	12h	24h	48h	72h	Média	12h	24h	48h	72h	Média
Gln	12,5	16,2	14,2	14,8	14,4	21,3	20,1	20,2	19,2	20,2
Ala	38,8	15,8	11,9	12,2	19,7	14,6	17,1	18,7	16,4	16,7
Asn	7,5	10,7	11,7	12,1	10,5	14,1	14,1	12,6	14,0	13,7
Pro	6,0	9,5	11,3	11,1	9,5	9,9	9,8	11,1	10,1	10,2
Val	5,7	9,0	9,8	10,1	8,6	9,3	9,7	10,3	10,1	9,9
Lys	5,6	7,7	8,5	8,3	7,5	9,2	8,5	9,7	8,3	8,9
Ser	4,5	7,4	7,5	7,2	6,7	5,8	5,7	4,3	6,0	5,4
Leu	4,0	6,2	7,0	6,9	6,0	4,6	4,4	4,0	4,8	4,5
Gly	3,8	4,7	5,1	5,2	4,7	4,5	3,9	3,1	3,9	3,9
Thr	2,7	3,5	4,2	3,8	3,6	2,7	2,5	2,3	2,7	2,5
Cys	2,7	3,4	3,5	3,4	3,2	2,0	2,1	1,3	2,3	1,9
Phe	2,6	2,7	2,0	2,1	2,4	0,8	0,9	1,0	1,0	0,9
Arg	2,3	2,1	1,8	1,4	1,9	0,6	0,6	0,8	0,6	0,7
Try	2,0	1,9	1,1	1,4	1,6	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6
Glu	1,9	0,6	1,2	1,7	1,3	0,5	0,2	0,3	0,4	0,3
Asp	0,9	0,7	0,7	0,8	0,8	0,4	0,4	0,6	0,2	0,4

Nota: NO₃⁻ (8 mM) ou NH₄⁺ (8 mM) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob hipoxia durante 72 horas. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

As concentrações dos aminoácidos Gln, Asn, Pro, Lys, Phe, Arg, Try, Glu e Asp foram reduzidas após indução da hipoxia para ambas as fontes nitrogenadas. O oposto ocorreu com o aminoácido Ala (Tabela 3).

Tabela 3 Médias da composição de aminoácidos (mol%) nas raízes de plantas de seringueira sob condições de normoxia e de hipoxia

Média				
Mol%	Normoxia		Hipoxia	
	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
Gln	16,0	23,8	14,4	20,2
Asn	10,8	18,0	10,5	13,7
Pro	10,4	12,2	9,5	10,2
Lys	8,6	9,6	7,5	8,9
Val	8,1	9,3	8,6	9,9
Ala	7,2	8,4	19,7	16,7
Ser	6,3	5,3	6,7	5,4
Leu	5,9	3,7	6,0	4,5
Gly	5,3	3,4	4,7	3,9
Thr	4,4	2,0	3,6	2,5
Cys	3,5	1,6	3,2	1,9
Phe	3,0	1,0	2,4	0,9
Arg	2,3	2,1	0,6	0,6
Try	2,0	1,9	0,6	0,5
Glu	1,9	0,6	0,5	0,2
Asp	0,9	0,7	0,4	0,4

3.4 de Compostos nitrogenados transportados na seiva do xilema

O transporte de NO₃⁻ na seiva do xilema é mostrado na Figura 4A. Nas plantas tratadas com NO₃⁻, a quantidade desse ânion na seiva do xilema foi significativamente menor sob hipoxia do que em condição de normoxia para quaisquer tempos estudados. Entre a primeira e a última avaliação, sob normoxia, os dados variaram de 7.000 nmol NO₃⁻.mL⁻¹ para 5.500 nmol NO₃⁻.mL⁻¹. Em condição de hipoxia, o transporte de NO₃⁻ reduziu de 2.000 nmol.mL⁻¹ para 1,0 nmol NO₃⁻.mL⁻¹. Com a aplicação do NH₄⁺, os resultados ficaram em torno de 70 nmol.mL⁻¹ independente da concentração de O₂ (Figura 4A).

A quantidade de NH_4^+ transportada no xilema (Figura 4B) foi muito menor que a quantidade de nitrato no xilema (1.000x), e, foi significativamente aumentada após o sistema radicular ser submetido à hipoxia, sendo que as mais altas quantidades foram observadas no tratamento com NH_4^+ . Nesse tratamento, sob hipoxia, a quantidade de NH_4^+ na seiva variou entre 2,2 nmol.mL^{-1} e 4,0 e no tratamento com NO_3^- , entre 1,6 nmol.mL^{-1} e 1,3. Por outro lado, sob normoxia, os resultados não variaram ao longo do período experimental mantendo-se em aproximadamente 0,3 no tratamento com NO_3^- e 2,3 no tratamento com NH_4^+ .

Quando a planta é submetida somente ao NH_4^+ , há dificuldade em controlar o influxo para dentro das células e quantidades significativas desse cátion podem ser transportadas pelo xilema até a parte aérea (BRITTO; KRONZUCKER, 2005). Sugere-se também que a atividade da GS é insuficiente para incorporar todo o NH_4^+ absorvido (PEARSON et al., 2002). De acordo com Troelstra et al. (1995), a entrada de NH_4^+ ocorre porque o NH_4^+ pode ocupar os sítios de absorção de cátions como K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} aumentando sua concentração no tecido da parte aérea e raiz. O suprimento de N sob a forma amoniacal normalmente é relatado como prejudicial para a maioria das culturas, e pode resultar na alteração de processos bioquímicos e metabólicos e fisiológicos (BRITTO; KRONZUCKER, 2005).

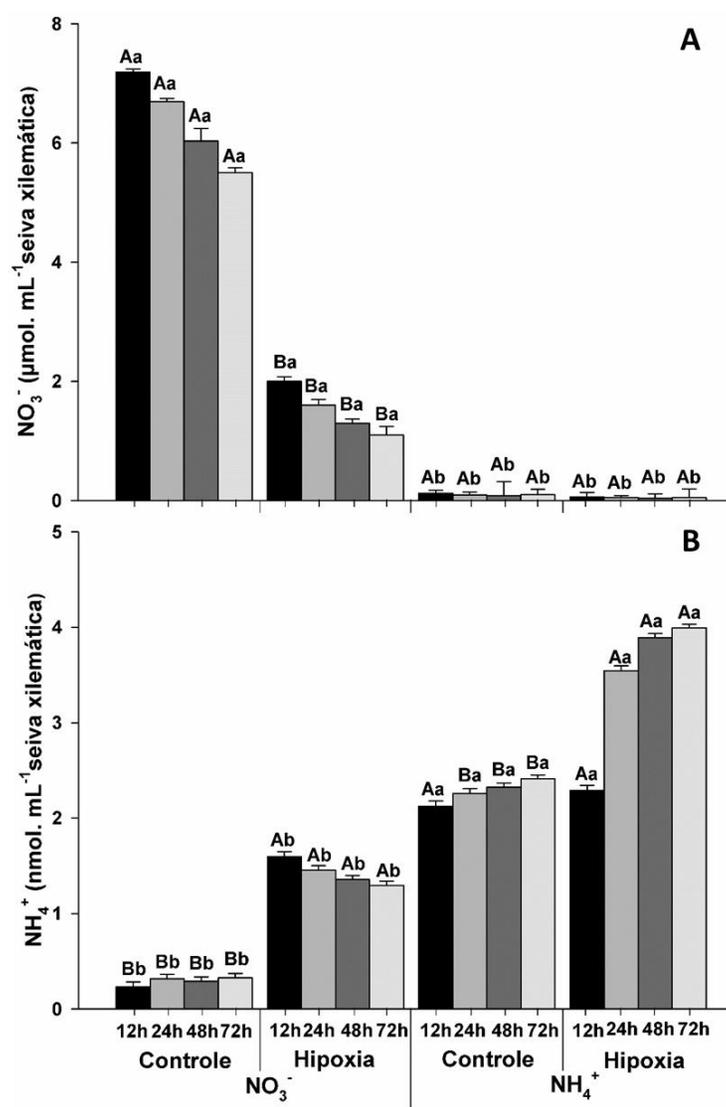


Figura 4 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no transporte de nitrato (A), e de amônio (B), no xilema de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

A análise da seiva xilemática mostrou que sob condição de normoxia, Glu e Gln foram os aminoácidos transportados em quantidades mais elevadas, independente da fonte de nitrogênio. Estes dois em conjunto representam aproximadamente 66% do total no tratamento com NO_3^- e 84% no tratamento com NH_4^+ (Tabela 4). Na sequência, são encontrados Asp, Arg, Ala, Asn, Ser, Gly, Val e Thr para ambos os tratamentos com nitrogênio.

Tabela 4 Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de normoxia

Mol%	Normoxia									
	NO_3^-					NH_4^+				
	12h	24h	48h	72h	Média	12h	24h	48h	72h	Média
Glu	74,9	32,6	32,5	38,7	44,7	69,3	64,3	49,7	65,3	62,2
Gln	5,8	25,7	19,4	34,8	21,5	18,4	19,1	26,3	24,3	22,0
Asp	4,8	11,0	15,6	5,3	9,2	3,0	3,4	7,4	3,3	4,3
Arg	2,9	8,7	8,2	4,6	6,1	2,7	2,5	3,0	2,5	2,7
Ala	2,7	4,5	5,2	4,2	4,1	2,4	2,3	2,6	2,4	2,4
Asn	2,4	3,6	4,7	2,1	3,2	2,1	2,0	2,4	1,7	2,1
Ser	2,4	3,4	4,7	1,9	3,1	1,7	1,7	2,3	1,6	1,8
Gly	1,8	2,2	4,5	1,9	2,6	1,3	1,6	2,3	1,4	1,7
Val	1,7	2,2	1,8	1,6	1,8	1,7	1,6	2,1	1,3	1,7
Thr	1,2	2,0	1,3	1,5	1,5	1,5	1,4	1,1	1,1	1,3

Nota: NO_3^- (8 mM) ou NH_4^+ (8 mM) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 72 horas. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

Entre os aminoácidos que foram transportados no xilema em anaerobiose, Ala se destacou, representando 50% no tratamento com NO_3^- e 34% no tratamento com NH_4^+ (Tabela 5). Além disso, nos tratamentos com NO_3^- e com NH_4^+ em condições de baixa disponibilidade de O_2 foram detectadas reduções nas quantidades de Asp e Glu.

Independente da fonte de N, a análise do transporte de compostos nitrogenados na seiva do xilema indicou que a hipoxia levou ao aumento do transporte de NH_4^+ e ao redirecionamento do metabolismo de aminoácidos nas raízes, particularmente no sentido de síntese de Ala. Quando se comparou a composição de aminoácidos das raízes e seivas das plantas normóxicas com a das plantas hipóxicas, observou-se que Glu, Asp e Asn diminuíram enquanto que Ala foi o aminoácido que se destacou apresentando expressivos aumentos. Esses resultados já haviam sido demonstrados em outras espécies por Sousa; Sodek, (2002); Rocha et al. (2010), os quais sugerem que em condições de hipoxia há estímulo para a síntese de Ala elevando sua concentração na composição de aminoácidos das raízes e da seiva. Conseqüentemente há um decréscimo dos seus precursores Asp, Glu ou Asn. Neste estudo, a aplicação de NO_3^- destacou-se, pois favoreceu maiores aumentos nas quantidades de Ala.

Tabela 5 Efeito da fonte de nitrogênio no transporte de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de seringueira sob condição de hipoxia

Mol%	Hipoxia									
	NO_3^-					NH_4^+				
	12h	24h	48h	72h	Média	12h	24h	48h	72h	Média
Ala	68,1	49,4	37,0	46,6	50,3	40,9	21,7	33,7	39,8	34,0
Gln	7,8	16,1	17,0	17,5	14,6	15,8	16,3	18,7	13,2	16,0
Glu	4,6	8,1	11,2	9,9	8,5	11,8	9,2	10,6	8,9	10,1
Asp	4,2	6,1	6,8	7,5	6,1	4,8	8,8	6,7	8,2	7,1
Asn	3,9	4,0	5,5	6,7	5,1	4,4	7,5	5,9	5,7	5,9
Gly	3,8	3,2	4,9	2,3	3,6	3,2	6,8	5,7	5,5	5,3
Ser	3,2	2,7	4,6	2,2	3,2	2,3	5,1	4,8	4,0	4,1
Arg	1,8	2,5	3,4	2,2	2,5	2,2	5,1	4,2	3,3	3,7
Val	1,6	2,3	2,6	2,2	2,2	1,9	4,4	3,0	2,7	3,0
Thr	1,5	2,0	1,9	2,1	1,9	1,2	3,1	2,9	2,5	2,4

Nota: NO_3^- (8 mM) ou NH_4^+ (8 mM) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 72 horas. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

A Tabela 6 resume os resultados das duas tabelas anteriores e mostra reduções nas quantidades de Glu e Gln e aumentos nas concentrações de Ala e Asn nos tratamentos sob hipoxia independente da fonte nitrogenada.

Tabela 6 Médias da composição de aminoácidos (mol%) na seiva de plantas de seringueira sob condições de normoxia e de hipoxia

Mol%	Média			
	Normoxia		Hipoxia	
	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
Glu	44,7	62,2	8,5	10,1
Gln	21,5	22,0	14,6	16,0
Asp	9,2	4,3	6,1	7,1
Asn	3,2	2,1	5,1	5,9
Ala	4,1	2,4	50,3	34,0
Arg	6,1	2,7	2,5	3,7
Ser	3,1	1,8	3,2	4,1
Gly	2,6	1,7	3,6	5,3
Val	1,8	1,7	2,2	3,0
Thr	1,5	1,3	1,9	2,4

3.5 Assimilação do N nas folhas

A RN não apresentou atividade nas folhas independente do tratamento aplicado, enquanto que as três enzimas GS, GOGAT e GDH tiveram suas atividades aumentadas significativamente em condições de alagamento. Em comparação com os controles, os acréscimos foram de 46% e 40% para GS, de 30% e 56% para GOGAT e de 45% e 21% para GDH nos tratamentos com NO₃⁻ e com NH₄⁺ respectivamente. Vale ressaltar ainda, que para as três enzimas, os dados encontrados no tratamento com NH₄⁺ sob hipoxia sobressaíram-se em relação aos outros tratamentos em todas as avaliações.

Nas folhas também houve influência da hipoxia na concentração de compostos nitrogenados, ocorrendo significativos aumentos nos teores de NH₄⁺.

Seja ele proveniente do transporte via xilema ou não, levou a uma elevação igualmente significativa nas atividades das enzimas GS, GOGAT e GDH. Sendo que esses acréscimos foram mais pronunciados diante da aplicação de NH_4^+ . Além disso, sob hipoxia o processo de oxigenação da Rubisco pode ter sido favorecido já que aumentos nas quantidades de Ser e Gly foram verificados. E a adição de NH_4^+ em solução estimulou ainda mais esse processo. Esses dados corroboram com os resultados observados em plantas de seringueira por Carneiro et al. (2015) que observaram aumento da fotorrespiração por esse cátion.

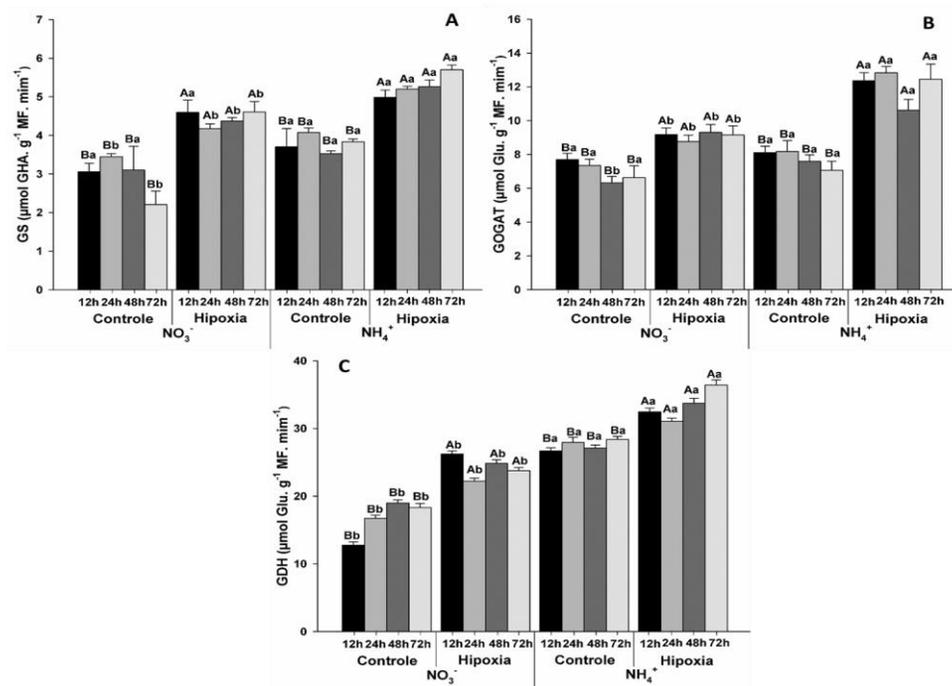


Figura 5 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nas atividades das enzimas glutamina sintetase (A), glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (B) e desidrogenase do glutamato (C), nas folhas de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

3.6 Teores de NO_3^- , NH_4^+ , N total e aminoácidos livres totais nas folhas

Não foi observada variação no teor de NO_3^- nas folhas das plantas tratadas com NH_4^+ . O valor encontrado foi de $3,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MS e manteve-se independente da disponibilidade de O_2 (Figura 6A). Para as plantas tratadas com NO_3^- , o alagamento afetou negativamente essa variável que diminuiu, em média, de $22,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MS para $17,0$.

O oposto foi observado para o teor de NH_4^+ nas folhas quando se comparou o controle e a hipoxia. Sob baixa disponibilidade de O_2 os resultados foram superiores, isto é, passaram de $6,2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MS para $9,6$ nas plantas submetidas ao NH_4^+ e de $2,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MS para $4,5$ nas tratadas com NO_3^- (Figura 6B).

Nas folhas, o teor de N não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e o valor verificado foi em torno de 4% (Figura 7A).

Os teores de aminoácidos livres totais nas folhas, sob normoxia, foram em média de $7,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MS para os dois tratamentos nitrogenados (Figura 7B), sob hipoxia, reduziram para $4,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MS diante da aplicação de NO_3^- e para $4,0$ com a adição de NH_4^+ .

Ficou evidente que o metabolismo do N foi bastante alterado durante a hipoxia, contudo, as causas e as finalidades desta alteração são ainda questionáveis. Acredita-se que NO_3^- tem um profundo efeito sobre o metabolismo anaeróbico e a sua presença no meio circundante aumenta a tolerância das plantas à inundação (KAISER; HUBER, 2001). Sugere-se ainda, que as plantas são capazes de “perceber” o N tanto interna como externamente, e modificar seu metabolismo (SAKAKIBARA, 2006). Algumas das respostas ao N são locais, restritas apenas às raízes expostas ao sinal nutricional, enquanto outras são sistêmicas, implicando em intrincadas rotas de percepção e sinalização de N (FORDE, 2002).

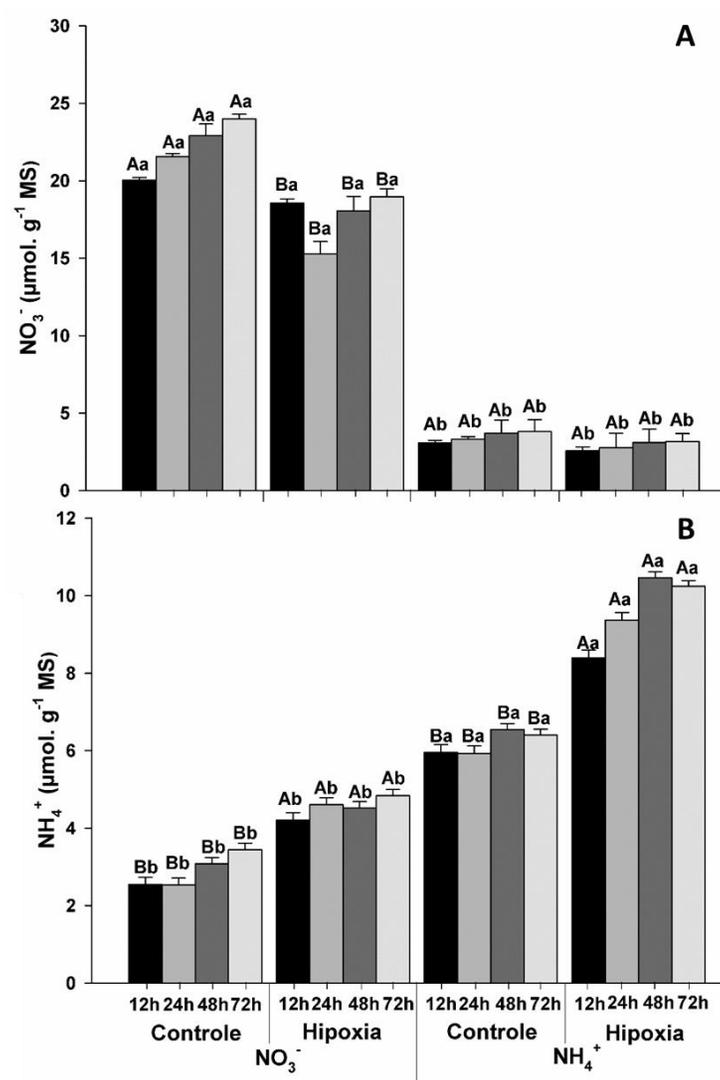


Figura 6 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrato (A), e de amônio (B), nas folhas de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

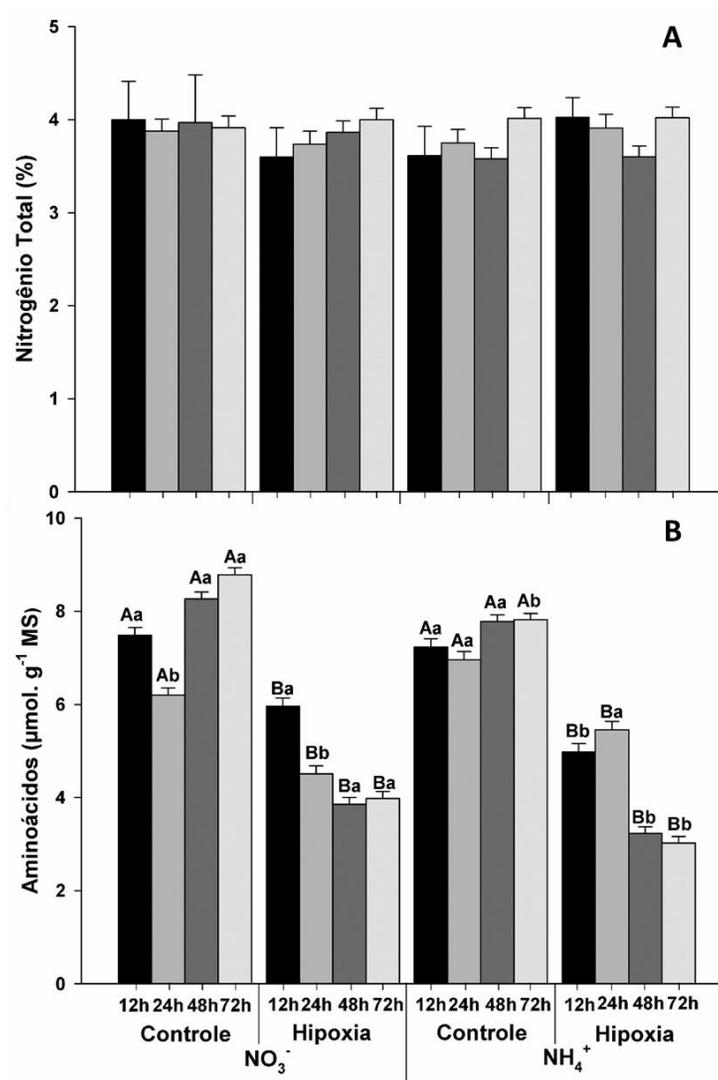


Figura 7 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrogênio total (A), e aminoácidos livres totais (B), nas folhas de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (hipoxia e controle) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

3.7 Composição de aminoácidos nas folhas

Sob normoxia, nas folhas, os aminoácidos constitutivos mais representativos foram Gln, Asn, Pro, Lys, Val, Asp, Glu e a Ala que juntos constituíram em torno de 55% dos aminoácidos em ambos os tratamentos nitrogenados (Tabela 7). Ao longo do experimento, algumas modificações na composição dos aminoácidos foram observadas, entretanto, pouco influenciaram na composição de aminoácidos das folhas.

Tabela 7 Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas folhas de plantas de seringueira sob condição de normoxia

Mol%	Normoxia									
	NO ₃ ⁻					NH ₄ ⁺				
	12h	24h	48h	72h	Média	12h	24h	48h	72h	Média
Gln	14,0	16,6	13,3	15,7	14,9	15,4	14,9	14,3	13,6	14,5
Asn	13,9	11,1	13,2	11,0	12,3	12,7	12,5	13,2	13,1	12,9
Pro	8,0	11,0	8,5	10,9	9,6	12,1	10,6	10,9	10,8	11,1
Lys	8,0	10,8	7,8	10,8	9,3	11,9	10,2	9,9	10,4	10,6
Val	7,5	9,6	7,6	10,4	8,8	8,5	7,1	6,9	7,7	7,6
Ala	7,0	7,9	7,5	7,5	7,5	8,0	6,9	6,8	7,3	7,2
Ser	6,5	7,3	6,2	7,0	6,8	7,6	6,8	6,4	6,7	6,9
Leu	6,4	6,5	6,1	6,4	6,3	6,6	6,2	6,2	6,3	6,3
Gly	6,4	5,7	6,0	5,4	5,9	5,9	6,2	6,1	5,1	5,8
Thr	5,3	3,7	5,5	3,4	4,5	3,9	4,8	5,0	5,0	4,7
Cys	5,0	2,4	5,3	2,2	3,7	2,6	4,4	4,3	4,6	4,0
Phe	4,7	2,3	4,5	1,8	3,3	1,9	3,9	3,8	4,1	3,4
Arg	3,1	1,6	2,8	1,6	2,3	1,3	2,9	2,9	1,9	2,3
Try	1,7	1,4	2,2	1,4	1,7	1,3	1,2	1,5	1,8	1,4
Glu	1,6	0,8	2,1	1,3	1,5	0,3	1,1	1,0	0,9	0,8
Asp	0,9	0,7	0,7	0,8	0,8	0,3	0,3	0,8	0,8	0,6

Nota: NO₃⁻ (8 mM) ou NH₄⁺ (8 mM) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob normoxia durante 72 horas. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

Nas folhas das plantas sob hipoxia (Tabela 8), a sequência dos aminoácidos encontrada foi semelhante a verificada nas plantas controle, isto é, sob normoxia (Tabela 7). Contudo, ressalta-se que ocorreram aumentos na quantidade de Ala de 7,5% para 10,2%, de Ser de 6,8% para 8,4% e de Gly de 5,9% para 7,8%, no tratamento com NO_3^- . Assim como houve elevação desses mesmos aminoácidos no tratamento com NH_4^+ de 7,2% para 10,7% de 6,9% para 9,8% e de 5,8% para 8% (Tabelas 7 e 8).

Tabela 8 Efeito da fonte de nitrogênio na composição de aminoácidos (mol%) nas folhas de plantas de seringueira sob condição de hipoxia

Mol%	Hipoxia									
	NO_3^-					NH_4^+				
	12h	24h	48h	72h	Média	12h	24h	48h	72h	Média
Gln	17,9	13,8	15,4	16,3	15,8	11,4	16,4	16,2	17,4	15,4
Asn	11,9	13,5	13,5	10,2	12,3	10,0	13,6	14,8	15,6	13,5
Pro	9,8	8,3	13,4	9,2	10,2	9,4	11,1	10,9	10,8	10,6
Lys	9,1	7,8	9,1	9,1	8,8	8,5	10,5	10,4	9,9	9,8
Val	9,0	7,7	7,8	7,5	8,0	7,7	10,4	9,7	9,7	9,4
Ala	11,0	9,9	9,8	10,3	10,2	7,0	8,5	12,4	15,0	10,7
Ser	6,7	8,6	8,4	9,8	8,4	6,1	10,0	10,3	12,9	9,8
Leu	6,4	6,5	5,4	5,7	6,0	6,1	5,6	5,8	4,5	5,5
Gly	6,3	6,9	8,5	9,4	7,8	18,0	6,1	4,0	4,0	8,0
Thr	3,1	5,1	3,8	4,6	4,2	4,4	3,7	3,5	3,6	3,8
Cys	2,4	4,9	3,6	3,8	3,7	4,3	3,7	3,5	2,4	3,5
Phe	2,3	4,6	2,4	2,8	3,0	2,9	1,8	3,5	2,1	2,6
Arg	2,0	2,6	2,0	2,5	2,3	2,3	1,7	0,8	1,8	1,6
Try	2,0	2,3	1,7	1,7	1,9	2,1	0,6	0,7	0,7	1,0
Glu	1,9	1,6	1,7	1,7	1,7	1,0	0,5	0,5	0,7	0,7
Asp	1,7	0,6	1,5	1,7	1,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,3

Nota: NO_3^- (8 mM) ou NH_4^+ (8 mM) foram adicionados à solução nutritiva na qual as raízes foram mantidas sob hipoxia durante 72 horas. Os aminoácidos foram determinados por HPLC aos 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

Diante do aumento dos aminoácidos Gly e Ser (relacionados ao ciclo fotorrespiratório), pode-se inferir que a hipoxia leva a um aumento na atividade fotorrespiratória em plantas jovens de seringueira. As variações observadas nas concentrações dos aminoácidos ao longo das avaliações provavelmente são decorrentes da influência da luz, ou seja, da noite e do dia, já que as avaliações, com exceção da primeira, foram realizadas a cada 24 horas.

Em média, nas folhas, observou-se que a hipoxia promoveu aumentos principalmente nas concentrações dos aminoácidos Gln, Ala, Gly e Ser independente da fonte nitrogenada. Para os demais aminoácidos, os resultados variaram de acordo com a fonte de nitrogênio aplicada (Tabela 9).

Tabela 9 Médias da composição de aminoácidos (mol%) nas folhas de plantas de seringueira sob condições de normoxia e de hipoxia

Mol%	Média			
	Normoxia		Hipoxia	
	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
Gln	14,9	14,5	15,8	15,4
Asn	12,3	12,9	12,3	13,5
Pro	9,6	11,1	10,2	10,6
Lys	9,3	10,6	8,8	9,8
Val	8,8	7,6	8,0	9,4
Ala	7,5	7,2	10,2	10,7
Ser	6,8	6,9	8,4	9,8
Leu	6,3	6,3	6,0	5,5
Gly	5,9	5,8	7,8	8,0
Thr	4,5	4,7	4,2	3,8
Cys	3,7	4,0	3,7	3,5
Phe	3,3	3,4	3,0	2,6
Arg	2,3	2,3	2,3	1,6
Try	1,7	1,4	1,9	1,0
Glu	1,5	0,8	1,7	0,7
Asp	0,8	0,6	1,4	0,3

4 CONCLUSÃO

O metabolismo do N foi alterado em condição de hipoxia, além disso, nitrato e amônio influenciaram de maneiras diferentes as respostas das plantas de seringueira à baixa disponibilidade de O₂.

Nas raízes, o alagamento reduziu os teores de nitrato e N total, assim como a atividade do sistema GS/GOGAT. Por outro lado, nesse tecido a hipoxia promoveu elevação das quantidades de amônio e aminoácidos livres totais bem como das atividades da RN e GDH.

Na seiva xilemática, a hipoxia favoreceu o transporte de amônio e afetou negativamente o transporte de nitrato.

A composição dos aminoácidos tanto nas raízes quanto na seiva do xilema foi alterada principalmente em relação ao aumento de Ala a partir do consumo de Gln, Asn, Asp e Glu.

Nas folhas, a condição hipóxica promoveu a queda nos teores de nitrato e aminoácidos livres totais, o oposto ocorreu com os teores de amônio, atividades da GS/GOGAT e GDH e concentrações de Ser, Gly e Ala.

REFERÊNCIAS

ALLÈGRE, A. et al. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 408, p. 2625-2634, 2004.

ARMSTRONG, W.; ARMSTRONG, J. Stem photosynthesis not pressurized ventilation is responsible for light-enhanced oxygen supply to submerged roots of alder (*Alnus glutinosa*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 591-612, 2005.

ARMSTRONG, W.; DREW, M. C. Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In: Waisel Y, Eshel A and Kafkafi U (Eds.). **Plant Roots: The Hidden Half**, New York, v. 3, p. 729-761, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 16 ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, MD, 1998.

BAILEY-SERRES, J.; CHANG, R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 507-518, 2005.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, 2008.

BERGER, J. A.; HARRISON, P. J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 1, p. 82-93, 1995.

BOTREL, A.; KAISER, W. M. Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. **Planta**, Berlin, v. 201, n. 4, p. 496-501, 1997.

BOTREL, A.; MAGNE, C.; KAISER, W. M. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Versailles, v. 34, n. 5, p. 645-652, 1996.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 1396-1409, 2005.

CARNEIRO, M. M. L. C. et al. Fotorrespiração e metabolismo antioxidante em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 10, n. 1, p. 66-73, 2015.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications of Soil Science and Plant Annals**, Philadelphia, v. 6, p.71-80, 1975.

COLMER, T. D.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 36, n. 8, p. 665-681, 2009.

CRAWFORD, L. A. et al. The synthesis of [gamma]-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 3, p. 865-871, 1994.

DAVIES, D. D. The fine control of cytosolic pH. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 67, n. 4, p. 702-706, 1986.

DINIZ, P. F. A. **Associação de bactérias diazotróficas na assimilação e transporte de nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea spp*)**. 2011. 253 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, 1997.

FAN, T. W. M. et al. Anaerobic nitrate and ammonium metabolism in flood-tolerant rice coleoptiles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 1655-1666, 1997.

FAN, T. W. M.; HIGASHI, R. M.; LANE, A. N. An in vivo ¹H and ³¹P NMR investigation of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 266, n. 2, p. 592-606, 1988.

FAN, T. W. M. et al. Anaerobic nitrate and ammonium metabolism in flood-tolerant rice coleoptiles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 1655-1666, 1997.

FORDE, B. G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 203-224, 2002.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia—is survival a balancing act?. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 9, p. 449-456, 2004.

GLAZEBROOK, H. S.; ROBERTSON, A. I. The effect of flooding and flood timing on leaf litter breakdown rates and nutrient dynamics in a river red gum (*Eucalyptus camaldulensis*) forest. **Australian Journal of Ecology**, Canberra, v. 24, n. 6, p. 625-635, 1999.

GROAT, R. G.; VANCE, C. P. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Developmental patterns and response to applied nitrogen. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 67, n. 6, p. 1198-1203, 1981.

GUPTA, K. J.; IGAMBERDIEV, A. U. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 537-543, 2011.

HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 431-444, 1996.

IGLESIAS, Domingo J. et al. Physiology of citrus fruiting. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 19, n. 4, p. 333-362, 2007.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 363, p. 1981-1989, 2001.

KATO-NOGUCHI, H. Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in lettuce roots in anoxia. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, n. 1, p. 28-33, 2000.

JASID, S.; SIMONTACCHI, M.; BARTOLI, C. G. PUNTARULO, S. Chloroplasts as a Nitric Oxide Cellular Source. Effect of Reactive Nitrogen

Species on Chloroplastic Lipids and Proteins. **Plant Physiology**, v.142, p.1246-1255, 2006.

LANZA, L. N. M.; ROSSI, S. C.; SODEK, L. Nitrogen fertilization benefits soybean under flooding conditions. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 2-9, 2013.

LIMAMI, A. M. et al. Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 2325-2335, 2008.

MARUR, C. J.; SODEK, L.; MAGALHÃES, A. C. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 103-108, 1994.

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, Havana, v. 17, n. 2, p. 297, 1967.

MILBURN, J. A.; RANASINGHE, M. S. A comparison of methods for studying pressure and solute potentials in xylem and also in phloem laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 135-143, 1996.

OLIVEIRA, H. C.; SALGADO, I.; SODEK, L. Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. **Planta**, Berlin, v. 237, n. 1, p. 255-264, 2013.

PATE, J. S.; LAYZELL, D. B. Carbon and nitrogen partitioning in the whole plant—a thesis based on empirical modeling. In: **Nitrogen and carbon metabolism**, Netherlands, n. 3, p. 94-134, 1981.

PEARSON, J. et al. Production and consumption of NH_4^+ and NH_3 in trees. In: **Trace gas exchange in forest ecosystems**, Netherlands, v. 3, p. 53, 2002.

PEETERS, A. J. M. et al. Submergence research using *Rumex palustris* as a model; looking back and going forward. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 368, p. 391-398, 2002.

RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and

glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 51, n. 3, p. 277-280, 1981.

REGGIANI, R. et al. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. **Amino Acids**, Wien, v. 18, n. 3, p. 207-217, 2000.

REGGIANI, R.; BRAMBILLA, I.; BERTANI, A. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots I. Nitrate reduction and pyridine nucleotide pools. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1193-1199, 1985.

RICARD, B. et al. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, p. 1-1, 1994.

ROBERTS, J. K. M. et al. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, n. 2, p. 480-487, 1992.

ROCHA, M. et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 3, p. 1501-1513, 2010a

ROCKEL, P. et al. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 366, p. 103-110, 2002.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 431-449, 2006.

SCHAFFER, B.; DAVIES, F. S.; CRANE, J. H. Responses of subtropical and tropical fruit trees to flooding in calcareous soil. **HortScience**, Alexandria, v. 41, n. 3, p. 549-555, 2006.

SETTER, T. L.; WATERS, I. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 1, p. 1-34, 2003.

SHINGAKI-WELLS, R. N. et al. Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel metabolic adaptations in amino acid

metabolism for tissue tolerance. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 156, n. 4, p. 1706-1724, 2011.

SKOPELITIS, D. S. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 18, n. 10, p. 2767-2781, 2006.

SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo do Goytacazes, v. 14, n. 2, p. 83-94, 2002.

STOIMENOVA, M. et al. The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots I. Characterization of root morphology and normoxic metabolism of wild type tobacco and a transformant lacking root nitrate reductase. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 1, p. 145-153, 2003.

STREETER, J. G.; THOMPSON, J. F. Anaerobic accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus*, L.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 49, n. 4, p. 572-578, 1972.

TABUCHI, A.; MATSUMOTO, H. Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n. 3, p. 353-358, 2001.

THOMAS, A. L.; SODEK, L. Development of the nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 17, n. 3, p. 291-297, 2005.

TROELSTRA, S. R.; WAGENAAR, R.; SMANT, W. Nitrogen utilization by plant species from acid heathland soils: I. Comparison between nitrate and ammonium nutrition at constant low pH 1. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 1103-1112, 1995.

YEMM, E. W.; COCCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, p. 209-213, 1955.

CAPÍTULO 4 Metabolismos do carbono e antioxidante em plantas de seringueira (*Hevea spp*) submetidas à hipoxia durante 72 horas na presença de nitrato ou amônio

RESUMO

Neste estudo, foi avaliado o papel do nitrogênio aplicado em solução nutritiva na forma de nitrato- NO_3^- (8mM de N) ou de amônio- NH_4^+ (8mM de N), na ecofisiologia e no metabolismo de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis*) submetidas à deficiência de O_2 . As medidas de trocas gasosas e as análises bioquímicas foram realizadas às 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos. A fotossíntese líquida, a condutância estomática e a taxa de transpiração nas plantas sob baixa disponibilidade de O_2 diminuíram significativamente em comparação com as plantas controle, independente da fonte de nitrogênio. No entanto, sob hipoxia, plantas tratadas com NO_3^- apresentaram uma relativa manutenção da assimilação de CO_2 superando aquelas nutridas com NH_4^+ . Assim, quando se compara as plantas tratadas com NO_3^- com as plantas tratadas com NH_4^+ , sob condições de alagamento, as primeiras foram caracterizadas por maior produção de sacarose, conseqüentemente, induzindo maiores atividades de todas as isoformas de invertase. Quando expostas à hipoxia, as plantas tratadas com NO_3^- também mostraram uma maior eficiência das enzimas do sistema antioxidante, visto que, o teor de H_2O_2 foi maior nas plantas tratadas com NH_4^+ . Portanto, pode-se inferir que a aplicação de NO_3^- é mais benéfica para a fisiologia de plantas de seringueira sob condições de deficiência de O_2 .

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*. Deficiência de oxigênio. Fotossíntese. Carboidratos. Isoformas de invertase. Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the role of nitrogen applied in nutrient solution in the form of nitrate NO_3^- (8 mM N) or ammonium- NH_4^+ (8 mM N), in the physiology and metabolism of rubber plants (*Hevea brasiliensis*) subjected to oxygen deficiency. The experiment was conducted over a period of 3 days, with measurements of gas exchange and biochemical analyzes performed at 12, 24, 48 and 72 hours after treatment induction. Net photosynthesis, stomatal conductance and transpiration rate in stressed plants decreased significantly when compared to the control plants, regardless of nitrogen source. However, under hypoxia, plants treated with NO_3^- showed relative stability of CO_2 assimilation, overcoming the treatment with NH_4^+ . Therefore, when comparing plants treated with NO_3^- and those treated with NH_4^+ under flooding conditions, the first presented higher sucrose production, thus showing higher invertase isoform activity. When exposed to stress, NO_3^- treated plants also showed higher antioxidant system efficiency. Therefore, H_2O_2 content was higher in plants treated with NH_4^+ . We concluded that NO_3^- is more beneficial for the physiology and metabolism of rubber tree plants than NH_4^+ under oxygen deficit conditions.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Oxygen deficiency. Photosynthesis. Carbohydrates. Invertase isoforms. Antioxidant enzymes.

1 INTRODUÇÃO

As plantas podem ser expostas à condição de excessiva umidade no solo, sendo o fornecimento de oxigênio (O_2) para o sistema radicular é dificultado devido à baixa taxa de difusão desse gás em água (ARMSTRONG, 1980). Dada a importância fundamental do O_2 no metabolismo aeróbico das plantas, o estresse por alagamento pode afetar fortemente o crescimento e a sobrevivência dessas nos ecossistemas agrícolas e naturais. Na verdade, a falta de O_2 nos substratos de cultivo influencia negativamente a produtividade de muitas espécies economicamente importantes (IRFAN et al., 2010). Em uma perspectiva metabólica, a deficiência de O_2 diminui a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, provoca um aumento relativo da produção de ATP por glicólise citosólica. A limitação de O_2 , acceptor terminal da cadeia respiratória mitocondrial, resulta na inibição de processos que demandam energia e na estimulação de vias de fermentação anaeróbica para a produção de ATP (BAILEY; VOESENEK-SERRES, 2008). No nível fisiológico, a deficiência de O_2 em raízes afeta funções-chave, como a absorção de nutrientes e água, assimilação líquida de CO_2 , condutância estomática/transpiração e translocação de carboidratos (KREUZWIESER et al., 2004; Carneiro et al., 2015). Há também um aumento descontrolado de radicais livres nas células. Contudo, estas diversas respostas à depleção de O_2 variam de acordo com a espécie e com a intensidade e duração do estresse (SHAO et al., 2008).

Diante disso, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa enzimático como estratégia de proteção contra o dano oxidativo. Os componentes chaves deste sistema incluem a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (MANIVANNAN et al., 2008; JALEEL et al, 2009).

Além disso, estudos indicam que as diferentes formas de N podem induzir respostas metabólicas distintas sob estresse (ESCOBAR et al., 2006; PATTERSON et al., 2010). Tem sido observado que o NO_3^- aumenta a tolerância de espécies de plantas sujeitas a deficiência de O_2 (ALEGRE et al., 2004; THOMAS; SODEK, 2005; HORCHANI et al., 2010). No entanto, é difícil fornecer uma explicação convincente para o efeito benéfico do NO_3^- durante a hipoxia, baseado unicamente no efeito direto da regeneração do NAD^+ pela redutase do nitrato (RN) (STOIMENOVA et al., 2003; LIBOUREL et al., 2006). Portanto, o efeito da interação, disponibilidade de O_2 *versus* fonte de N, sobre o metabolismo das plantas ainda não é completamente compreendido (SOUSA; SODEK 2003; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar alterações fisiológicas em plantas de seringueira com o sistema radicular alagado na presença de diferentes fontes de N (NO_3^- ou NH_4^+). Examinou-se os efeitos do alagamento associado às fontes nítrica e amoniacal sobre as trocas gasosas, o metabolismo de carboidratos e sistema antioxidante.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo das plantas e condições experimentais

Plantas de seringueira foram obtidas a partir de sementes e cultivadas em casa de vegetação (21 ° 14' S, 45 ° 00' W, altitude 918 m). As condições ambientais no interior da casa de vegetação foram: temperatura entre 18 °C (mínima) e 40 °C (máxima) resultando em uma temperatura média de 29 °C; média de umidade relativa do ar de 56% e cerca de 12 horas de fotoperíodo. Sementes do clone GT1 previamente selecionadas por tamanho e peso foram germinadas em canteiros com areia. Quinze dias após a germinação, as plantas de características morfológicas semelhantes foram selecionadas e transplantadas para vasos contendo 5 L de areia e irrigadas com solução nutritiva de Bolle-Jones, (1957) ½ da força e preparada com 2 mM de NO_3^- e 2 mM de NH_4^+ até indução dos tratamentos. O volume e o pH das soluções foram monitorados diariamente, sendo o volume completado e o pH ajustado para $5,5 \pm 0,5$ quando necessário. Em intervalos semanais, as soluções eram completamente substituídas.

2.2 Tratamentos e coletas

Quando as plantas atingiram seis meses de idade, elas foram agrupadas em quatro tratamentos, sendo constituídos de solução completa de Bolle-Jones (1957) com 8 mM de N na forma de $\text{NO}_3^-/\text{KNO}_3$, ou 8 mM de N na forma de $\text{NH}_4^+ / (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e duas condições de disponibilidade de O_2 , controle: plantas mantidas sob normoxia no sistema radicular com solução nutritiva e aeração constante, e hipoxia: plantas em solução nutritiva sem aeração, simulando alagamento do sistema radicular. Ambos os sais nitrogenados utilizados eram

enriquecidos com 10% de marcação isotópica para futuras análises de rastreamento isotópico de compostos nitrogenados. As avaliações das trocas gasosas, do teor de clorofila e as coletas dos materiais vegetais, folhas e raízes para as análises químicas, foram realizadas às 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

2.3 Avaliações das trocas gasosas e do teor de clorofila

As medições das trocas gasosas foram realizadas no folíolo central da terceira folha totalmente expandida (estádio D) entre 9 e 10 horas. A taxa líquida de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*gs*), concentrações intracelular e ambiental de CO₂ (*Ci e Ca*), e a taxa transpiratória (*E*) foram obtidas utilizando um analisador portátil de trocas gasosas, IRGA modelo LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, EUA.

O teor de clorofila foi determinado ao longo do experimento utilizando o clorofilômetro portátil FT GREEN LLC modelo atLEAF+.

2.4 Atividade das isoformas de invertase

Foram avaliadas as atividades das três isoformas de invertase: ácida do vacúolo (INV AV), neutra do citosol (INV NC) e ácida da parede (INV PC), em amostras de tecidos de folhas e raízes coletadas às 12, 24, 48 e 72 horas após a indução dos tratamentos.

Amostras de 0,5 g de folha ou raiz foram maceradas em N₂ líquido. Em seguida adicionou-se 1,5 mL de meio extrator constituído de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), PMSF (1 mM), MgCl₂ (5 mM) e DTT (1 mM). Posteriormente, o conjunto foi centrifugado a 18.000 g a 4 °C, durante 20 minutos (CAIRO et al., 2009). O sobrenadante foi utilizado como fonte bruta

das enzimas para avaliação da atividade das invertases solúveis e o *pellet* utilizado para extrair a invertase ácida da parede. Para a extração da invertase ácida da parede, a metodologia foi realizada de acordo com Fahrendorf; Beck (1990) com algumas modificações. Foi utilizado o mesmo tampão de extração das invertases solúveis, no entanto, foram adicionados NaCl 1M e Triton-X (1%). Posteriormente, centrifugou-se, a 18.000 g a 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático.

O meio de reação (2 mL) para as invertases solúveis foi constituído de tampão citrato de sódio 0,4M pH 4,5, MgCl₂ 5 mM e sacarose 200 mM, ou tampão fosfato de potássio 0,2 M e pH 7,5, MgCl₂ 5 mM e sacarose 200 mM para isoformas vacuolar e citosólica respectivamente.

Para invertase apoplástica, o meio de reação (1,5 mL) foi constituído de tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 3,5, MgCl₂ 5 mM e sacarose 200 mM. A temperatura de incubação para ambas foi de 37 °C e alíquotas foram coletadas aos 10 e 70 minutos para determinação das atividades enzimáticas, as quais foram avaliadas pela quantificação de açúcares redutores produzidos, segundo o método DNS descrito por Miller (1959). As atividades foram expressas em µmol de açúcares redutores (AR) por grama de matéria fresca por hora.

2.5 Determinação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose

Os açúcares foram extraídos pela homogeneização de 1 g de folhas ou raízes em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM e pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por duas vezes e os sobrenadantes, combinados. Para a quantificação de açúcares solúveis totais, foi utilizado o método Antrona (DISCHE, 1962), e para os açúcares redutores, o protocolo descrito por Miller

(1959), por meio do método DNS. A concentração de sacarose foi estimada pela diferença entre açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

2.6 Enzimas do metabolismo antioxidante e conteúdo de H₂O₂

Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir de 200 mg de tecidos foliares ou radiculares macerados em N₂ líquido acrescido de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) insolúvel, adicionou-se 1,5 mL do tampão de extração composto de: Fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM e ácido ascórbico 200 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado foi utilizado para quantificação das atividades da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX). A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da CAT foi determinada conforme Havir; McHale (1987). A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 mM⁻¹ cm⁻¹, conforme descrito por Azevedo et al. (1998). A atividade da APX foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), por meio do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm e o coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

O H₂O₂ foi determinado a partir de 200 mg de tecidos macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C. Mediu-se a absorvância a 390 nm em um meio de

reação, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA et al., 2000).

2.7 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2 x 4. Sendo os quatro tratamentos compostos por duas fontes de N (nitrato ou amônio) e duas condições de O₂ (normoxia ou hipoxia). Foram realizadas quatro coletas (12, 24, 48 e 72h) com quatro repetições totalizando 64 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de clorofila e produção de matéria seca

A Figura 1 apresenta a produção de matéria seca foliar (1A), matéria seca radicular (1B) e o teor de clorofila (1C). Em relação à matéria seca, tanto de folha quanto de raiz, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Esses resultados mostram que as plantas utilizadas no experimento eram uniformes quanto ao desenvolvimento de folhas e raízes. Em média, a matéria seca da folha representou 30% do total e a matéria seca radicular foi 12% da massa seca total.

O teor de clorofila foi significativamente reduzido em plantas submetidas à hipoxia. Isto é, a hipoxia induziu uma queda de 15% para ambos os tratamentos nitrogenados, porém, entre as fontes não se verificou diferença para essa variável.

De acordo com os resultados a seguir, as plantas sob condições normais de O_2 apresentaram respostas fisiologicamente mais adequadas que as observadas nas plantas sob hipoxia, e, quando se comparou os efeitos das fontes nitrogenadas no metabolismo das plantas sob hipoxia para a maioria das variáveis avaliadas, a aplicação de NO_3^- foi mais favorável atenuando com mais eficácia os efeitos da baixa disponibilidade de O_2 .

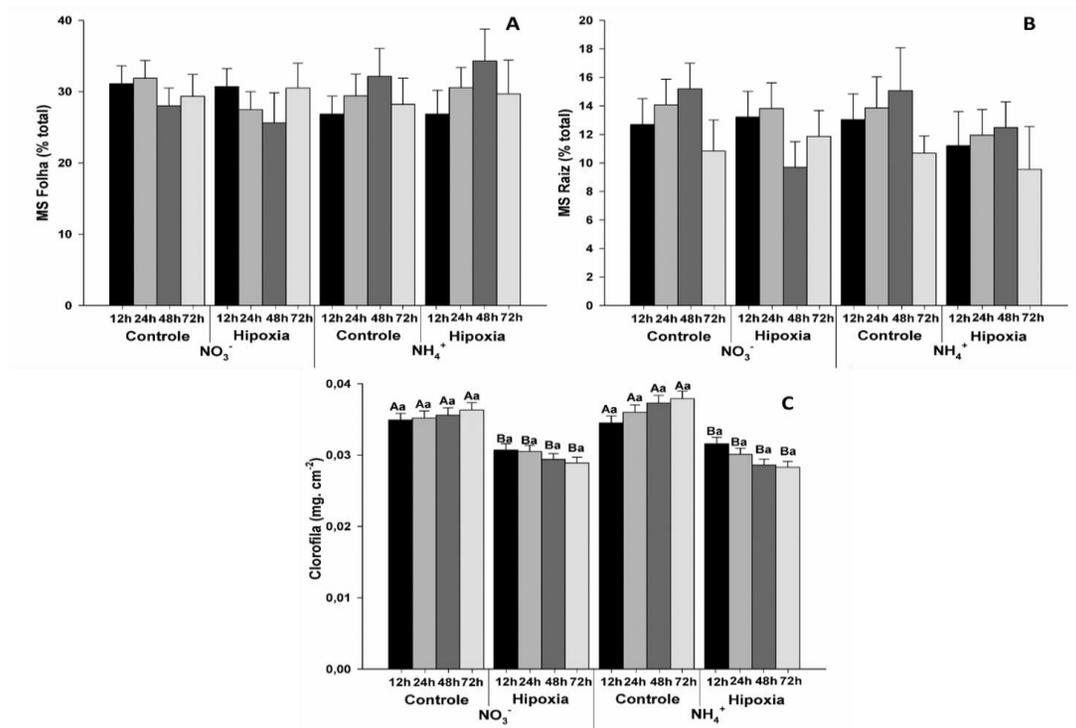


Figura 1 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no teor de clorofila (A), na matéria seca foliar (B), e na massa seca radicular (C) de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

3.2 Trocas gasosas

A análise de variância para taxa de fotossíntese líquida (A), relação entre carbono interno e carbono externo (C_i/C_a), taxa transpiratória (E) e condutância estomática (g_s) indica significância para a interação fonte nitrogenada *versus* disponibilidade de O_2 , para as quatro variáveis avaliadas (Figuras 2 e 3).

Na Figura 2A, podem ser observadas reduções na A sob hipoxia em comparação com seus respectivos controles. Em ambos os tratamentos com N, as plantas em condições de normoxia apresentaram maiores A . O alagamento causou uma redução na A de $4,0 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para $2,0$ (50%) no tratamento com NO_3^- . Na presença de NH_4^+ , a queda nessa variável foi ainda mais drástica, de $5,0 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para $1,2$ o que representa uma redução de 76%.

Por outro lado, a razão C_i/C_a (Figura 3B) foi significativamente aumentada após a submissão do sistema radicular à hipoxia. Os acréscimos foram de $0,4$ para $0,6$ no tratamento com NO_3^- e de $0,5$ para $0,8$ no tratamento com NH_4^+ .

Na Figura 3A, observa-se que a condutância estomática assim como a A também foi afetada negativamente pela deficiência de O_2 . Verificou-se uma redução de aproximadamente 50% na g_s nos tratamentos com inundação do sistema radicular independente da fonte nitrogenada aplicada em solução. Plantas tratadas com NO_3^- diminuíram a g_s de $0,04 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para $0,02$ enquanto que no tratamento com NH_4^+ , a g_s decresceu de $0,07 \text{ mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em condições normais de O_2 , para $0,035$ após o alagamento.

Verificou-se para a E (assim como para A e g_s) que as plantas sob hipoxia também apresentaram reduções significativas quando comparadas com os respectivos controles. Sendo os valores sob normoxia de $2,2 \text{ mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e $3,6$ enquanto que sob hipoxia os resultados reduziram para $1,0 \text{ mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

$^2.s^{-1}$ e 1,7 (aproximadamente 50%) nos tratamentos com NO_3^- e com NH_4^+ respectivamente (Figura 3B).

Ao nível da folha, o declínio da condutância estomática para evitar a perda da água, juntamente com a diminuição da atividade da Rubisco constituem uma primeira resposta de defesa contra a privação de O_2 . (KOZLOWSKI, 1997).

A fotossíntese representa a principal fonte de carbono nas plantas superiores, e quando prejudicada como em situações de baixa disponibilidade de O_2 , afeta toda a dinâmica do metabolismo do carbono. Na verdade, embora variável, a manutenção da performance fotossintética é associada a tolerância das plantas à inundação (ARBONA et al., 2009). Nesse trabalho, vale ressaltar que, sob déficit de O_2 , a assimilação de CO_2 foi superior em plantas tratadas com NO_3^- as quais mostraram maior capacidade de conservação do processo fotossintético.

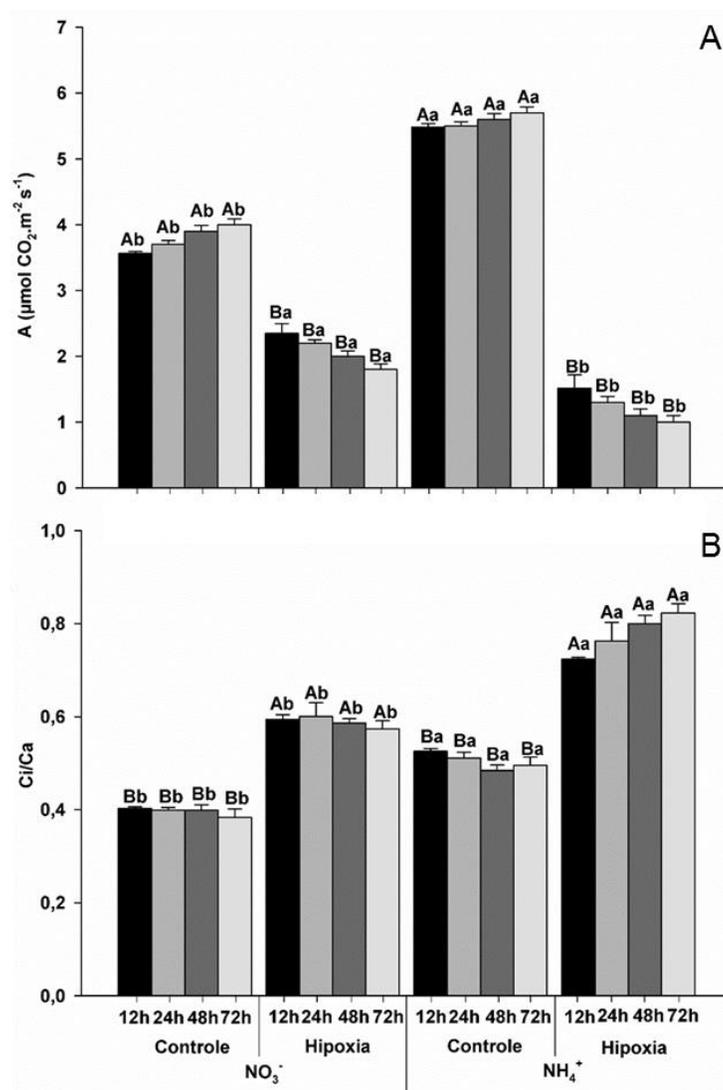


Figura 2 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na taxa fotossintética líquida (A), e na relação Ci/Ca (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

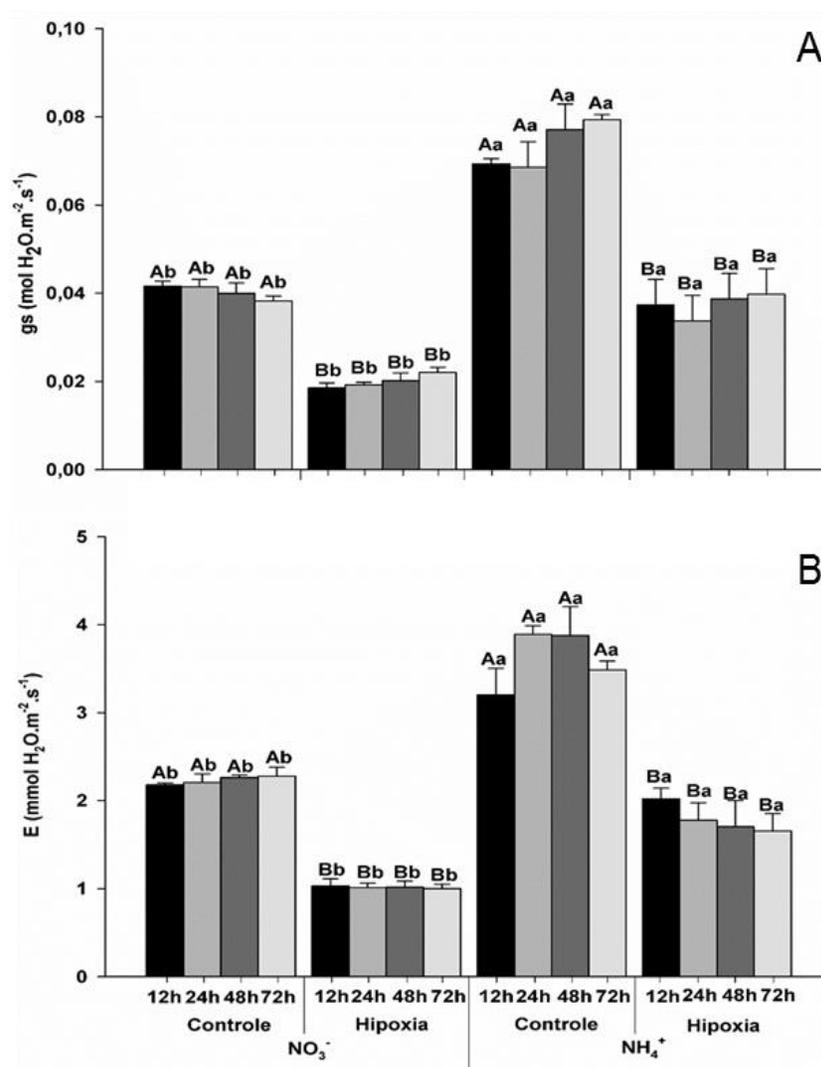


Figura 3 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na condutância estomática (A), e na taxa transpiratória (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

3.3 Atividade das isoformas de invertase

O alagamento reduziu a atividade de todas as isoformas de invertase tanto nas folhas quanto nas raízes, independente da fonte nitrogenada. Além disso, na condição de déficit de O_2 , verificou-se que os resultados obtidos com NO_3^- foram superiores aos resultados com NH_4^+ em todas as avaliações e em ambos os tecidos analisados (Figuras 4, 5 e 6). Observou-se também que nos tecidos foliares as atividades das três isoformas de invertase foram superiores em relação aos radiculares. Ressalta-se ainda, que as invertases, ácida do vacúolo (INV AV) (Figuras 4A e 4B) e neutra do citosol (INV NC) (Figuras 5A e 5B) apresentaram menores atividades quando comparadas à invertase ácida da parede celular (INV PC) (Figuras 6A e 6B).

Conforme apresentado na Figura 4, a atividade da INV AV, nas plantas com NO_3^- , caiu em média 44% na folha e 40% na raiz. Já nas plantas com NH_4^+ essas reduções chegaram a 57 e 67% respectivamente.

Como mencionado anteriormente, a INV NC foi superior nas plantas sob normoxia. Sob hipoxia foram observadas diferenças entre os tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ . Sob hipoxia, nas folhas e nas raízes, o tratamento com NO_3^- apresentou resultado superior ao tratamento com NH_4^+ . Nas folhas observou-se valores de $26 \mu\text{mol AR.g}^{-1} \text{MF. h}^{-1}$ no tratamento com NO_3^- e $18 \mu\text{mol AR.g}^{-1} \text{MF. h}^{-1}$ com NH_4^+ (70%), (Figura 5A). Nas raízes, os resultados foram $6,0 \mu\text{mol AR.g}^{-1} \text{MF. h}^{-1}$ no tratamento com NO_3^- e $3,0 \mu\text{mol AR.g}^{-1} \text{MF. h}^{-1}$ com NH_4^+ (50%), (Figura 5B). Quanto as INV PC, a baixa disponibilidade de O_2 proporcionou reduções nas atividades. Nas folhas, o decréscimo em relação ao controle foi, em média, de 40% e de 50% nas plantas tratadas com NO_3^- e com NH_4^+ respectivamente (Figura 6A). Nas raízes, mais uma vez NO_3^- superou NH_4^+ , a diminuição foi de $29,0 \mu\text{mol AR.g}^{-1} \text{MF.h}^{-1}$ para $22,0$ (25%) e de $35,0$ para $18,0$ (49%) respectivamente.

Os carboidratos constituem as principais reservas de carbono das plantas e as suas quantidades, a manutenção do seu metabolismo em níveis apropriados e o correto particionamento dessas moléculas associadas com energia, são pré-requisitos para a sobrevivência a estresses (GOGGIN et al., 2007). Os resultados mostraram que quando sob hipoxia, a diminuição significativa na concentração de açúcares solúveis, principalmente sacarose, foi acompanhada de uma redução na atividade de todas as isoformas de invertase e conseqüentemente na quantidade de açúcares redutores. Algumas explicações são possíveis para o declínio das atividades das invertases em ambientes alagados, incluindo, a degradação de enzimas pré-existentes e a limitação de substrato para a indução da enzima. Sendo assim, a expressiva queda da atividade das invertases solúveis e insolúvel no tratamento com NH_4^+ provavelmente deve-se à restrição de substrato nessas plantas.

As mudanças na demanda de carboidratos sob condições adversas alteram partição de carbono de acordo com a relação fonte-dreno, sendo que a taxa e o potencial são dependentes de vias de sinalização bioquímicas e moleculares complexas. Entre as vias enzimáticas afetadas, as envolvidas na degradação da sacarose têm sido objeto de estudo extensivo (KOCH, 1996). Assim, em conjunto com alterações nas propriedades físicas vasculares, bem como o carregamento e transporte no floema, contribuem para as diversas respostas observadas. Portanto, a regulação das vias catabólicas contribuem para melhores respostas ao estresse (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

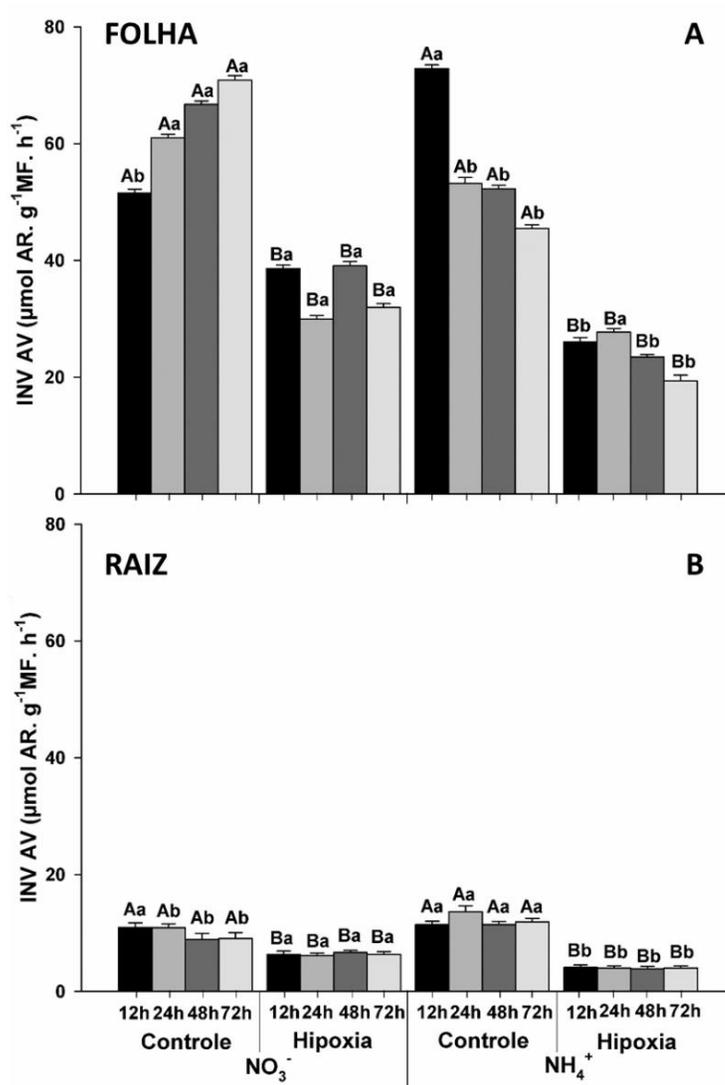


Figura 4 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase ácida do vacúolo em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

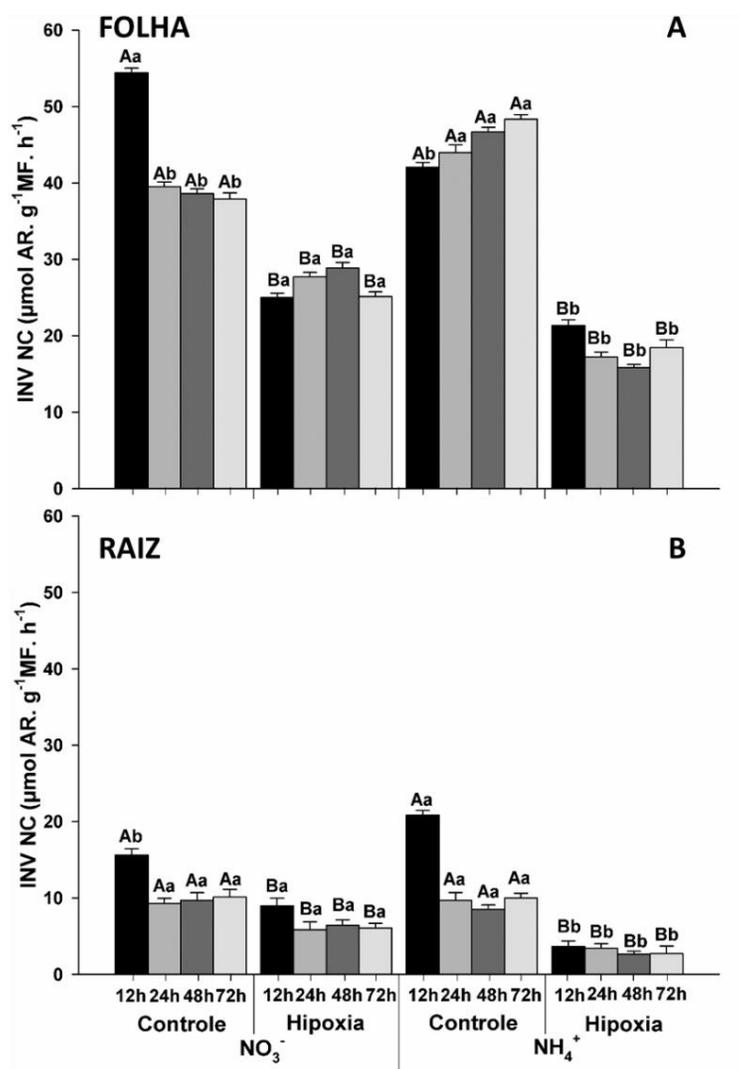


Figura 5 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase neutra do citosol em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

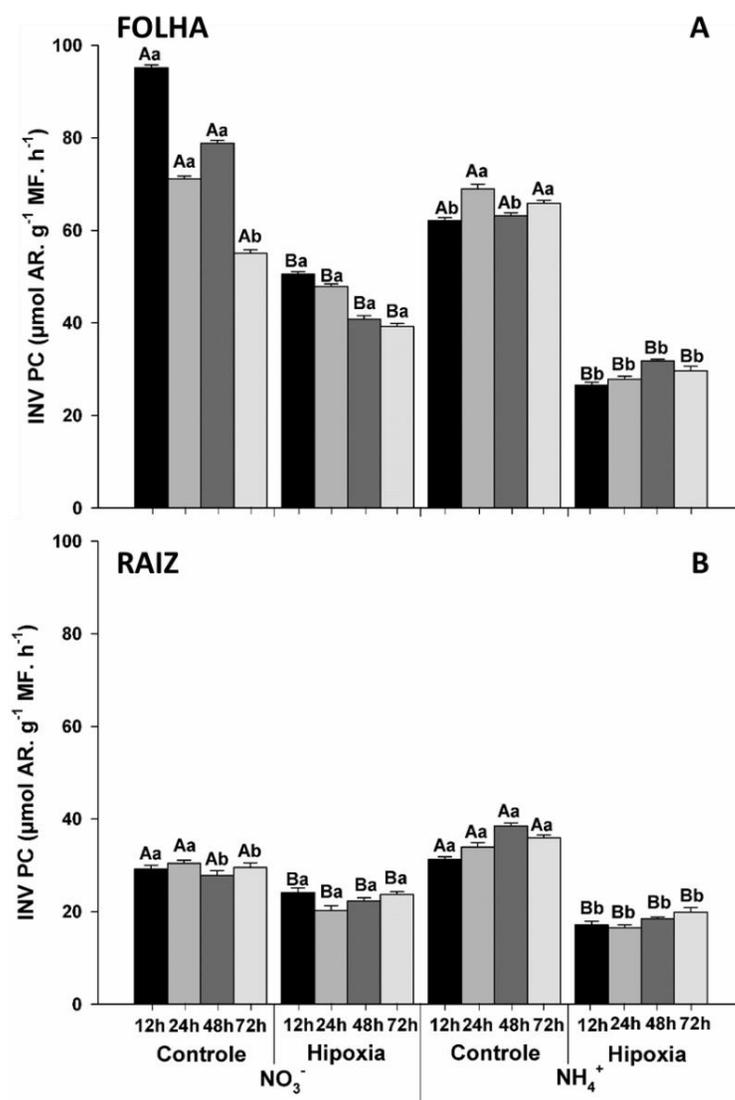


Figura 6 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase ácida da parede celular em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

3.4 Açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose

Os teores de carboidratos, assim como as atividades das invertases, reduziram significativamente após indução do alagamento, esse comportamento foi observado nas folhas e nas raízes em ambas as fontes de nitrogênio. Quando se compara controle e hipoxia, nas folhas, os açúcares solúveis totais diminuíram de aproximadamente 400 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF para 250 (37,5%) no tratamento com NO_3^- e de 400 para 190 (52,5%) com NH_4^+ . Nas raízes esse decréscimo foi de aproximadamente 140 para 80 (42,8%) com NO_3^- e de 170 para 50 (70%) com NH_4^+ (Figuras 7A e 7B).

Os açúcares redutores como parte dos açúcares totais, também reduziram acentuadamente. Sob normoxia os resultados encontrados tanto para NO_3^- quanto para NH_4^+ foram em torno de 200 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF nas folhas e aproximadamente 65 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF nas raízes. Porém, sob hipoxia, NO_3^- apresentou valores médios de 150 nas folhas e de 40,0 nas raízes. Com NH_4^+ as médias foram de 100 e de 25 respectivamente (Figuras 8A e 8B).

Para sacarose nos dois tecidos avaliados a hipoxia levou a uma queda de aproximadamente 50% no tratamento com NO_3^- e de 70% com NH_4^+ . (Figuras 9A e 9B).

Em plantas alagadas há um declínio dos processos metabólicos, de modo que isso implica em reduções na concentração de carboidratos (WARDLAW, 1990). Nesse experimento foram detectadas diferenças estatísticas nas concentrações de carboidratos. Sacarose, glicose e frutose são os principais açúcares não estruturais presentes nos vegetais e os resultados apontam para mudanças importantes em suas concentrações as quais foram significativamente reduzidas sob hipoxia em ambos os tratamentos nitrogenados. Porém, sob deficiência de O_2 , o melhor desempenho fotossintético das plantas tratadas com NO_3^- , em relação as tratadas com NH_4^+ , levou a uma maior produção de sacarose

nas folhas e conseqüentemente elevando a quantidade desse dissacarídeo nas raízes. Tem sido relatado que um maior teor de carbono solúvel em raízes alagadas, favorece o adequado estado fisiológico de plantas durante curtos períodos de estresse (GESSLER et al., 2007).

Os efeitos metabólicos e fisiológicos da hipoxia sobre as plantas podem ser derivados principalmente de um colapso da respiração aeróbica mitocondrial da raiz. As respostas iniciais frequentemente observadas incluem reduções do fluxo de água a partir das raízes seguida por alterações no uso da água, na absorção de nutrientes e no particionamento de carboidratos (COLMER; VOESENEK, 2009).

Na comparação entre tecidos foliares e radiculares, observou-se que as concentrações de açúcares foram superiores nos foliares. Esses resultados podem ser explicados pela ocorrência do ciclo fútil da sacarose.

A síntese da sacarose e sua acumulação em plantas superiores é o resultado de uma extensa rede de interações. As taxas de acumulação variam conforme genótipo da planta, o estágio de desenvolvimento e o ambiente no qual as plantas estão inseridas. Os vegetais percebem e respondem ao ambiente por meio de uma complexa rede de percepção e transdução de informações, resultando em ações coordenadas que inclui o acúmulo de sacarose (MOORE, 2005).

A sacarose pode ser metabolicamente ciclada ao invés de ser armazenada, tendo importância na dinâmica dos carboidratos. O chamado ciclo fútil da sacarose, a constante clivagem e a ressíntese da sacarose permitem maior flexibilidade e controle sobre o metabolismo de carboidratos e sua partição. O ciclo fútil ainda se relaciona com a regulação gênica influenciando a ação de fatores de transcrição (NGUYEN-QUOC; FOYER, 2001).

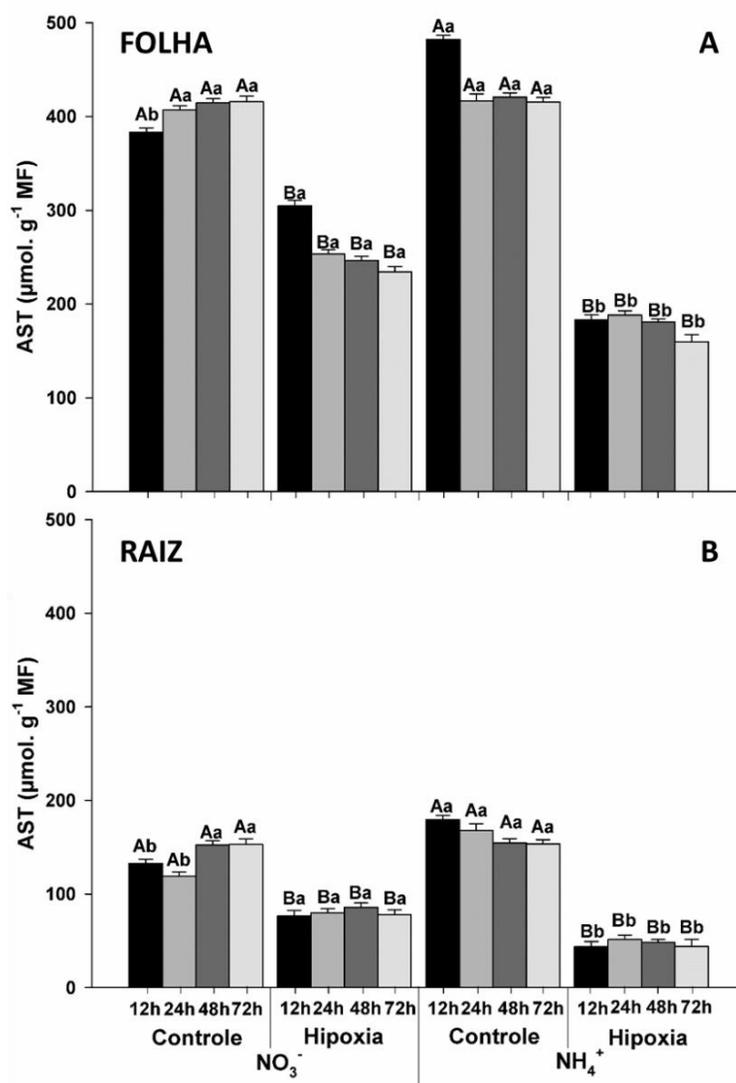


Figura 7 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares solúveis totais em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

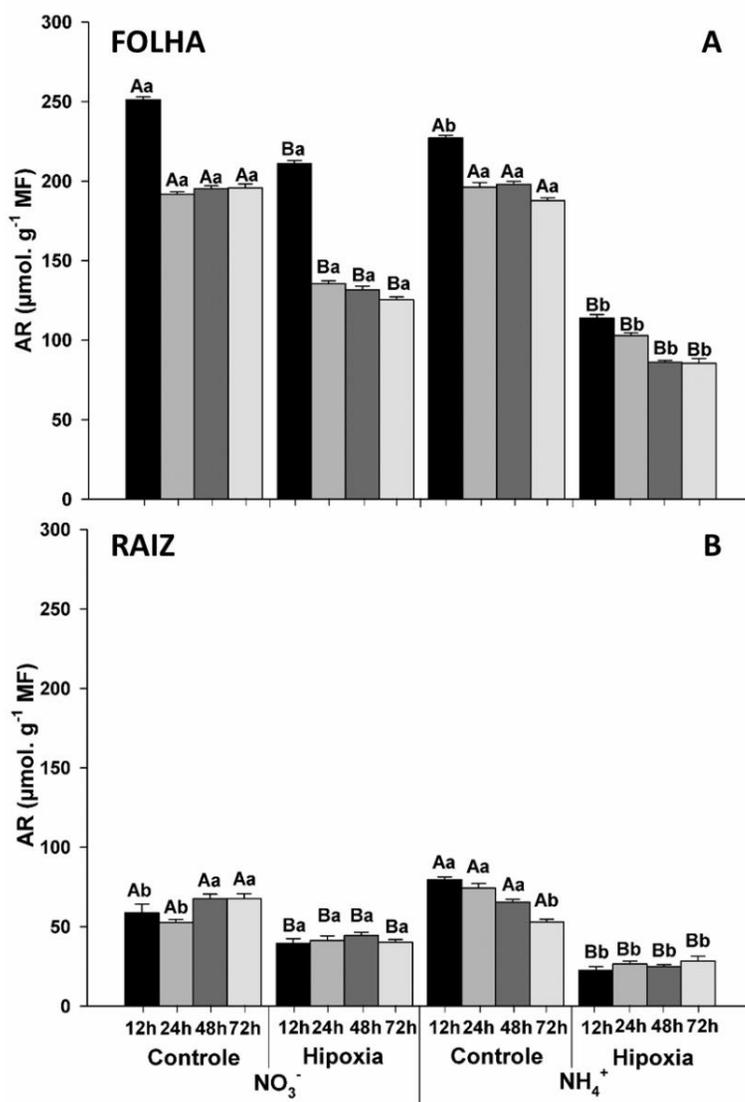


Figura 8 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares redutores em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

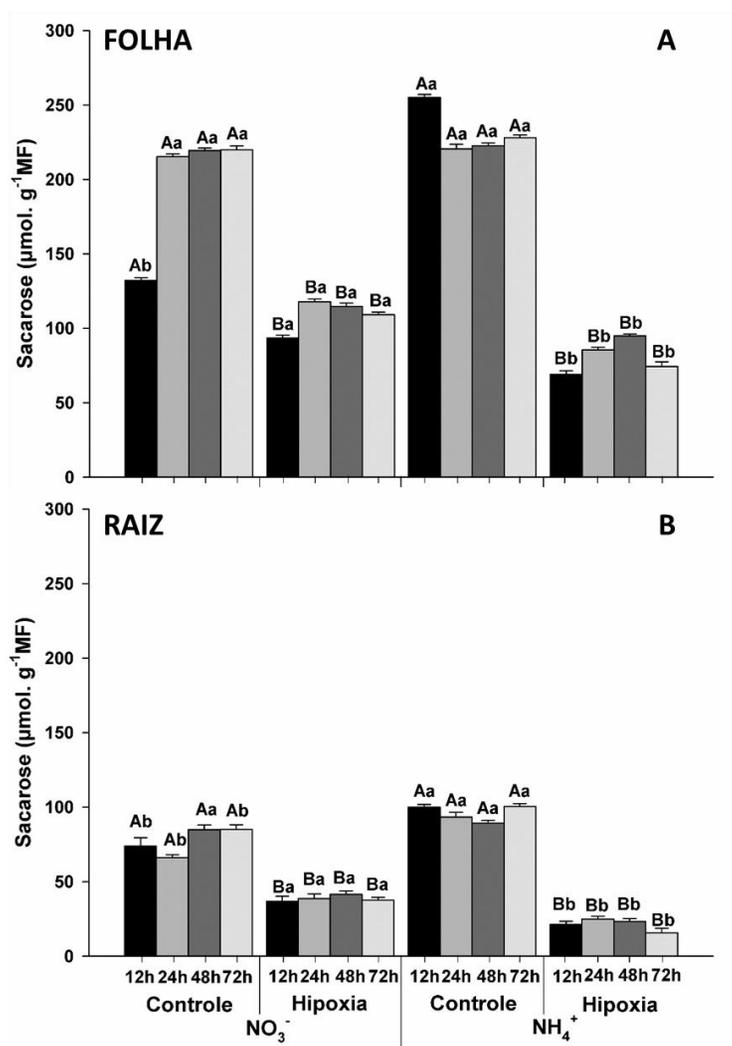


Figura 9 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na concentração de sacarose em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

3.5 Atividade das enzimas SOD, APX E CAT e conteúdo de H₂O₂

Em relação à atividade da SOD nas folhas, não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Figura 10A). O resultado obtido foi de aproximadamente 126 U.g⁻¹ MF, o qual permaneceu constante ao longo do período experimental. Nas raízes, (Figura 10B), quando analisado o efeito da disponibilidade de O₂, observou-se aumentos significativos na atividade da enzima SOD nas plantas sob hipoxia, cujos valores elevaram-se em 22%, de 265 U.g⁻¹ MF para 325 tanto na presença de NO₃⁻ quanto de NH₄⁺.

De acordo com a Figura 11, nos tratamentos sob hipoxia, verificou-se incrementos significativos na atividade da APX, quando comparada aos seus respectivos controles, independente da fonte de N aplicada e do tecido avaliado. Para essa enzima, nas folhas, o alagamento causou um aumento, em média, de 75% nas plantas tratadas com NO₃⁻ e de 40% nas tratadas com NH₄⁺ (Figura 11A). Nas raízes, as maiores atividades da APX foram observadas em plantas alagadas tratadas com NO₃⁻. Os resultados obtidos com esse ânion foram significativamente superiores independente da disponibilidade de O₂, sendo que, após a indução do alagamento a atividade da APX atingiu 155 μmol ASA.g⁻¹.MF.min⁻¹. Enquanto que, nas plantas sob hipoxia, submetidas ao NH₄⁺ os valores chegaram a 130 μmol ASA.g⁻¹. MF.min⁻¹ (Figura 11B), isto representa 87% do valor observado com NO₃⁻.

A atividade da CAT (Figura 12) tanto no tecido foliar quanto radicular foi positivamente influenciada pela hipoxia. Nas folhas, dobrou nas plantas tratadas com NO₃⁻ e elevou-se em 80% nas plantas tratadas com NH₄⁺ (Figura 12A). Nas raízes, o acréscimo em relação ao controle foi, em média, de 150% e de 60% nas plantas tratadas com NO₃⁻ e com NH₄⁺ respectivamente (Figura 12B).

Em concordância com os resultados anteriormente descritos, o conteúdo de H_2O_2 foi superior nas plantas expostas à hipoxia independente do tecido e da fonte de N. Nas folhas, sob normoxia não foram observadas diferenças entre os tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ . No entanto, sob hipoxia, as plantas tratadas com NH_4^+ apresentaram produção de H_2O_2 40% superior ao tratamento com NO_3^- . Nas raízes, essa variável comportou-se de forma similar às folhas, porém em escala muito superior. Contudo, a síntese de H_2O_2 na presença de NH_4^+ mostrou-se ainda mais significativa, sendo 65% maior quando comparada ao tratamento com NO_3^- (Figuras 13A e 13B).

Vale ressaltar ainda, que para as três enzimas do sistema antioxidante e para o conteúdo de H_2O_2 , os dados encontrados em tecidos radiculares superaram os resultados obtidos em tecidos de folhas em todas as avaliações, e esse menor desempenho permaneceu independente da disponibilidade de O_2 e da fonte de N.

Os processos metabólicos nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e parede celular podem direcionar para reações em cadeia gerando EROs, que causam o estresse oxidativo (PANDA; KHAN, 2009). O alagamento intensifica esse estresse em diversas espécies vegetais sendo potencialmente prejudicial às células da planta (JALEEL et al., 2009), uma vez que o acúmulo de EROs leva a uma cascata de eventos que se inicia com a peroxidação de lipídeos, avança para degradação de membranas e morte celular (PANDA; KHAN, 2009). Em contrapartida, como uma estratégia de proteção, as plantas amplificam seu sistema de defesa composto por enzimas tais como SOD, CAT e APX que detoxificam as células (JALEEL et al., 2009). Neste experimento, com exceção da SOD nas folhas, para a qual não se observou diferenças estatísticas, as plantas sob hipoxia apresentaram maiores atividades da SOD, CAT e APX. Essa elevação pode ser explicada principalmente pelo aumento dos substratos nessa condição. Além disso, observou-se uma maior eficiência do sistema antioxidante

nas plantas tratadas com NO_3^- de modo que o teor de H_2O_2 foi maior nas plantas tratadas com NH_4^+ . A eficácia das enzimas antioxidantes é proporcional à tolerância das plantas ao estresse oxidativo (ALLEN et al., 1997). Logo, evitar a superprodução de EROs, as quais são altamente danosas às estruturas e aos componentes celulares, é fundamental para as plantas principalmente sob condições adversas (GIANNAKOULA et al., 2010).

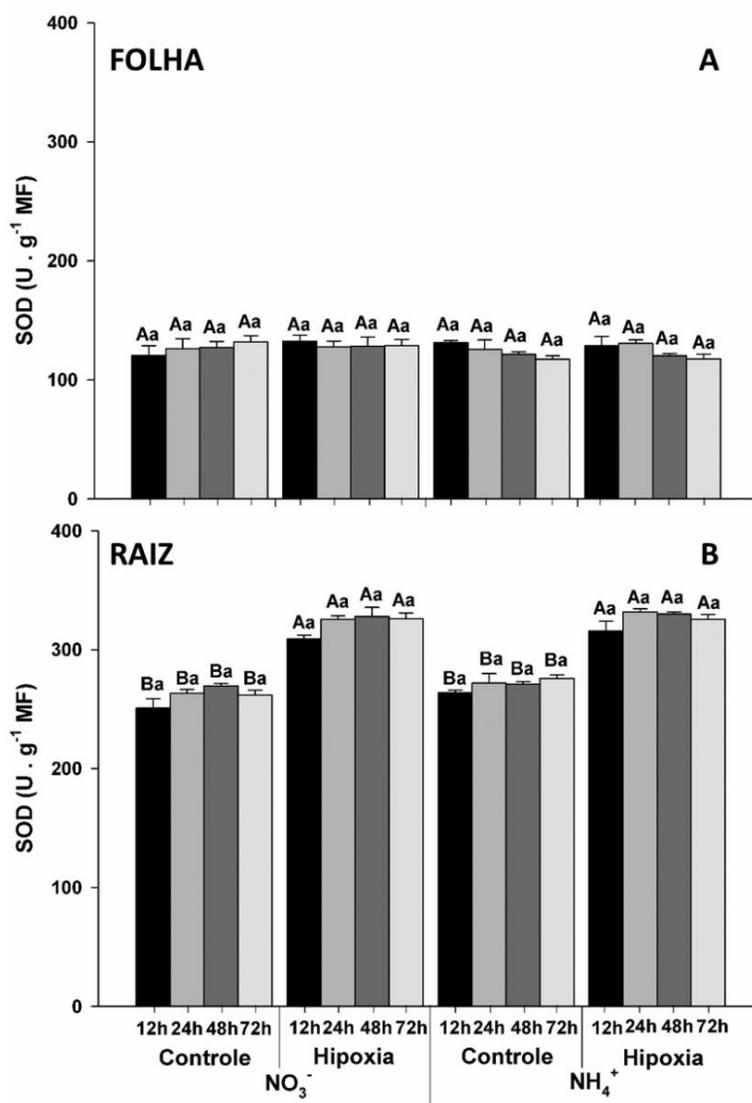


Figura 10 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da dismutase do superóxido em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

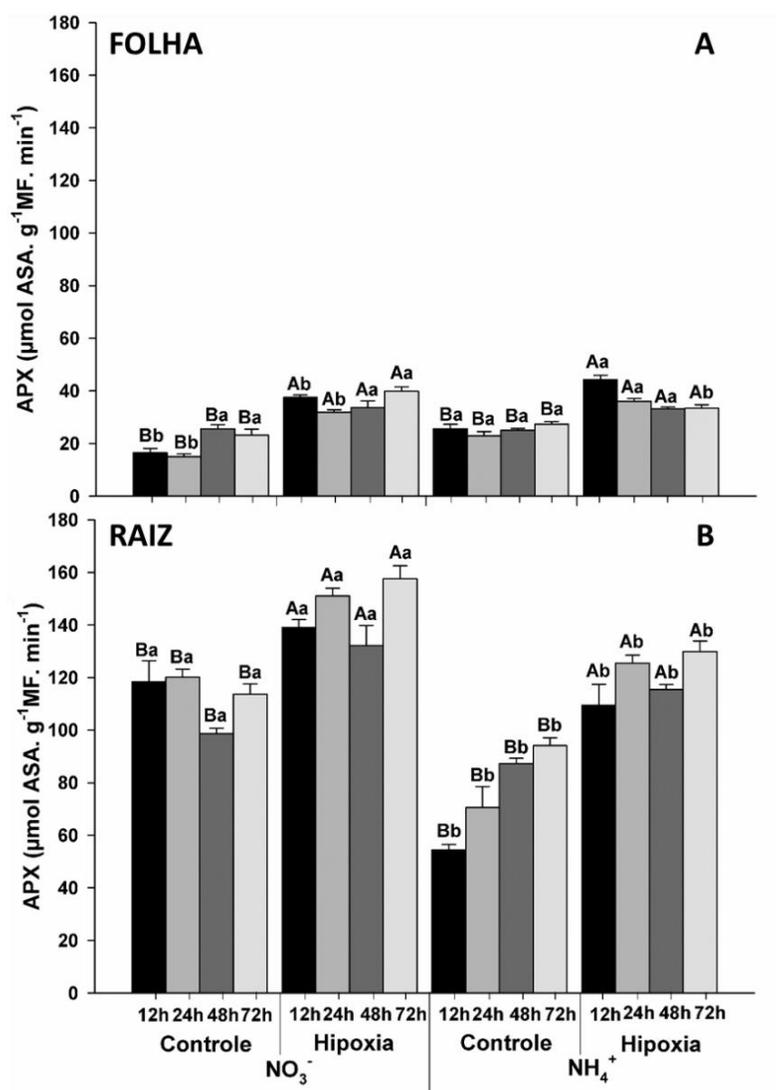


Figura 11 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da peroxidase do ascorbato em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

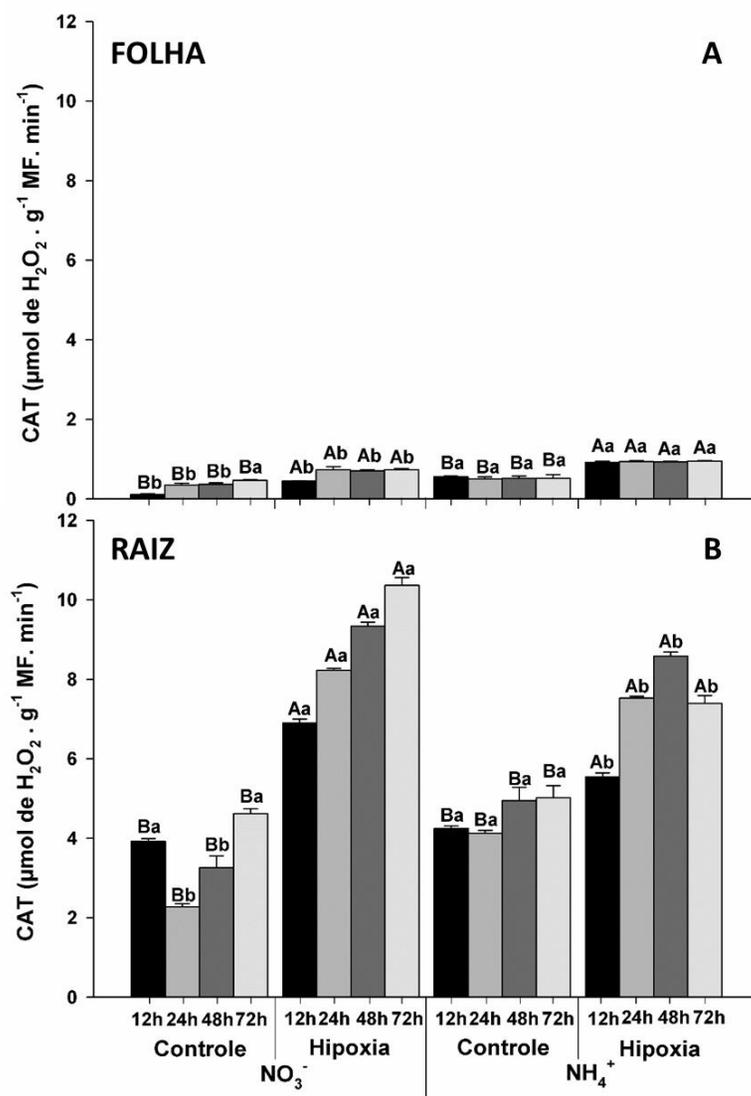


Figura 12 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio na atividade da catalase em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

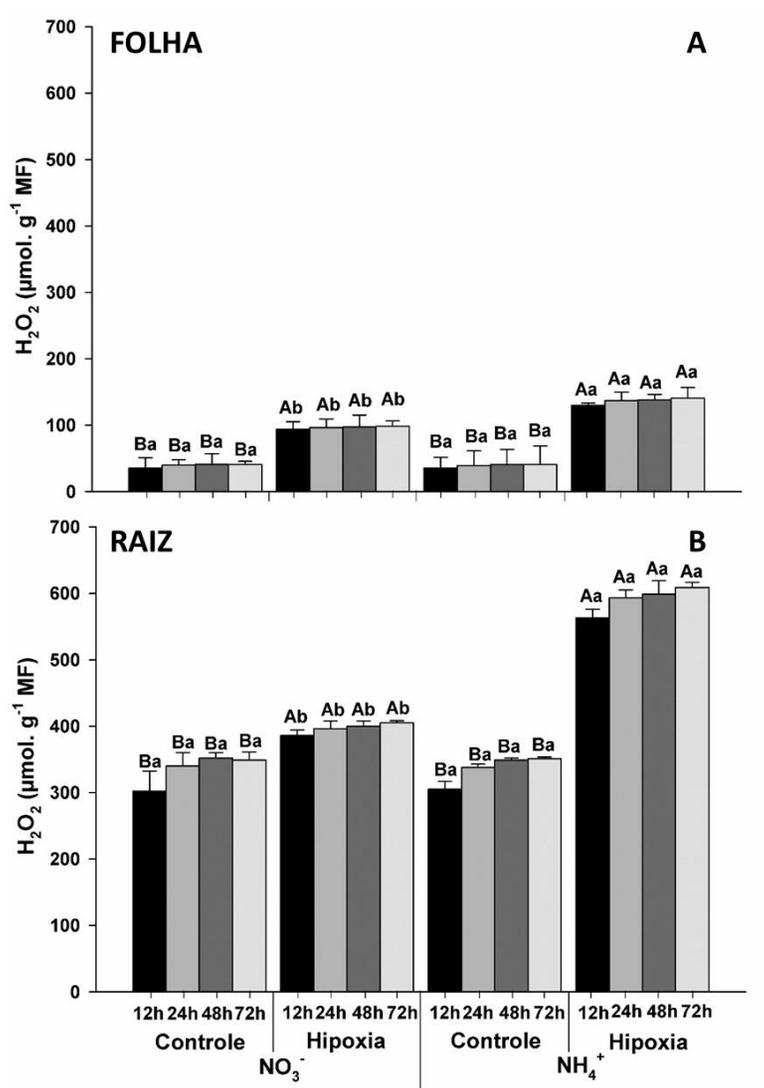


Figura 13 Efeito da disponibilidade de oxigênio e da fonte de nitrogênio no conteúdo de H_2O_2 em folhas (A), e raízes (B), de plantas de seringueira

Legenda: As letras maiúsculas comparam a disponibilidade de oxigênio (controle e hipoxia) em cada tempo avaliado (12, 24, 48 e 72 horas) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), letras minúsculas comparam as fontes de nitrogênio em cada tempo avaliado dentro de cada condição de oxigênio. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média das quatro repetições.

Este trabalho apresentou uma análise do efeito da interação nitrogênio, seja na forma de NO_3^- ou de NH_4^+ , *versus* deficiência de O_2 na fisiologia e no metabolismo de plantas de seringueira. Verificou-se que a condição de hipoxia interferiu nas diversas variáveis analisadas afetando as folhas e as raízes. A investigação das trocas gasosas, do metabolismo de carboidratos e das enzimas antioxidantes demonstraram claramente que as fontes de N influenciaram de forma distinta as plantas de seringueira que se encontravam sob hipoxia do sistema radicular, sendo que, diferenças significativas foram detectadas entre plantas tratadas com NO_3^- e com NH_4^+ .

Sabe-se que as plantas variam muito na sua susceptibilidade e nas suas respostas à privação de O_2 . No entanto, o controle sobre o pH citosólico é um fator importante e comum na determinação da tolerância de muitas espécies. (XIA; SAGLIO 1992). Estudos com plantas tolerantes à inundação como *Oryza sativa*, *Echinochloa phyllopogon* e *Potamogeton pectinatus* indicam uma capacidade para evitar acidez (KENNEDY et al., 1992). E embora os mecanismos para a manutenção do pH não estejam claramente definidos, existe correspondência com a utilização de carboidratos (SUMMERS et al., 2000) e com o metabolismo do N (ROCHA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

Desse modo, tem sido proposto que a conversão de NO_3^- a NO_2^- no citosol seria capaz de regenerar NAD^+ e consumir prótons, por conseguinte, atuar como uma via alternativa para a fermentação durante hipoxia, reduzindo a acidez citosólica (GARCIA-NOVO; CRAWFORD, 1973; STOIMENOVA et al., 2007). Além disso, é sugerido que o NO_2^- originado a partir do NO_3^- pode atuar como receptor alternativo de elétrons, substituindo o O_2 na cadeia respiratória, produzindo NO e oxidando o NADH para a síntese de ATP, assim, a síntese de NO_2^- a partir de NO_3^- teria um papel relevante na manutenção da funcionalidade mitocondrial durante a deficiência de O_2 (GUPTA; IGAMBERDIEV, 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Por outro lado, plantas

cultivadas apenas com NH_4^+ não realizam as reações de redução do NO_3^- a NO_2^- e redução do NO_2^- a NH_4^+ . Esse fenômeno pode apresentar efeitos prejudiciais, principalmente para plantas sob hipoxia, pois não recicla equivalentes redutores. Além disso, sabe-se que a primeira reação para assimilação do NH_4^+ é catalisada pela GS que é dependente de ATP. A relação ATP/ADP torna-se reduzida sob privação de O_2 afetando a atividade dessa enzima (LIMAMI et al., 2008) e levando ao acúmulo de um de seus substratos (NH_4^+) que tem efeitos deletérios sobre as funções celulares (GIVAN, 1979).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a assimilação do CO₂, o metabolismo e alocação de carboidratos, e a atividade das enzimas do sistema antioxidante são influenciados pela hipoxia. Respostas distintas foram evidenciadas entre os tratamentos com NO₃⁻ e com NH₄⁺.

As trocas gasosas, as concentrações de carboidratos e a atividade das isoformas de invertase reduziram em plantas sob hipoxia independente da fonte de nitrogênio.

As atividades das enzimas do sistema antioxidante apresentaram aumentos nas plantas expostas à baixa disponibilidade de oxigênio independente do tecido avaliado e da fonte nitrogenada.

REFERÊNCIAS

- ALLÈGRE, A. et al. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 408, p. 2625-2634, 2004.
- ALLEN, R. D.; WEBB, R. P.; SCHAKE, S. A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, Boston, v. 23, n. 3, p. 473-479, 1997.
- ARBONA, V. et al. Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, n. 1, p. 135-142, 2009.
- ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advances in Botanical Research**, New York, p. 697. 1979.
- AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, 2007.
- BOLLE-JONES, E. W. Copper: Its effects on the growth and composition of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and soil**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 160-178, 1957.
- CAIRO, P. A. R.; OLIVEIRA, L. E.M.; MESQUITA, A. C. Activity of rubisco and enzymes of sucrose synthesis and hydrolysis associated to latex productivity, in rubber tree clones [*Hevea brasiliensis* (Willd ex. ADR. de Juss.) Muell.-Arg] cultivated in Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 369-376, 2009.
- COLMER, T. D.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 36, n. 8, p. 665-681, 2009.

DISCHE, Z. Color reactions of carbohydrates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 475-514, 1962.

ESCOBAR, M. A.; GEISLER, D. A.; RASMUSSEN, G. Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. **The Plant Journal**, Barcelona, v. 45, n. 5, p. 775-788, 2006.

FAHRENDORF, T.; BECK, E. Cytosolic and cell-wall-bound acid invertases from leaves of *Urtica dioica* L.: a comparison. **Planta**, Berlin, v. 180, n. 2, p. 237-244, 1990.

GARCIA-NOVO, F.; CRAWFORD, R. M. M. Soil aeration, nitrate reduction and flooding tolerance in higher plants. **New Phytologist**, London, v. 72, n. 5, p. 1031-1039, 1973.

GESSLER, A. et al. $\delta^{13}\text{C}$ of organic matter transported from the leaves to the roots in *Eucalyptus delegatensis*: short-term variations and relation to respired CO_2 . **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 34, n. 8, p. 692-706, 2007.

GIANNAKOULA, A. et al. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 67, p. 487-494, 2010.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GIVAN, C. V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 375-382, 1979.

GOGGIN, F. L. Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n. 4, p. 399-408, 2007.

GUPTA, K. J.; IGAMBERDIEV, A. U. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 537-543, 2011.

- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rochville, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HORCHANI, F.; ASCHI-SMITI, S.; BROUQUISSE, R. Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. **Acta physiologiae plantarum**, Amsterdam, v. 32, n. 6, p. 1113-1123, 2010.
- IRFAN, M. et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, Wien, v. 241, n. 1-4, p. 3-17, 2010.
- JALEEL, C. A. et al. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 427-436, 2009.
- KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 100, n. 1, p. 1-6, 1992.
- KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 509-540, 1996.
- KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, Victoria, v. 1, n. 1, p. 1-29, 1997.
- KREUZWIESER, J.; PAPADOPOULOU, E.; RENNENBERG, H. Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 6, n. 3, p. 299-306, 2004.
- LIBOUREL, I. G. L. et al. Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. **Plant Physiology**, Rochville, v. 142, n. 4, p. 1710-1717, 2006.
- LIMAMI, A. M. et al. Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 2325-2335, 2008.
- MANIVANNAN, P. et al. Protection of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. plants from salt stress by paclobutrazol. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 315-318, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

- MOORE, P. H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. **Field Crop Research**, Amsterdam v. 92, p. 119-135, 2005.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NGUYEN-QUOC, B.; FOYER, C. H. A role for futile cycles involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 881-889, 2001.
- OLIVEIRA, H. C.; SALGADO, I.; SODEK, L. Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. **Planta**, Berlin, v. 237, n. 1, p. 255-264, 2013.
- PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under Short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Oxford, v. 195, n. 6, p. 442-454, 2009.
- PATTERSON, K. et al. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1486-1501, 2010.
- ROCHA, M. et al. Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. **Amino Acids**, Wien, v. 39, n. 4, p. 1043-1053, 2010.
- SHAO, H-B. et al. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Sciences**, Macau, v. 4, n. 1, p. 8, 2008.
- SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo do Goytacazes, v. 14, n. 2, p. 83-94, 2002.
- STOIMENOVA, M. et al. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 2, p. 465-474, 2007.

STOIMENOVA, M. et al. The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots I. Characterization of root morphology and normoxic metabolism of wild type tobacco and a transformant lacking root nitrate reductase. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 1, p. 145-153, 2003.

SUMMERS, J. E.; RATCLIFFE, R. G.; JACKSON, M. B. Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1413-1422, 2000.

THOMAS, A. L.; SODEK, L. Development of the nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo do Goytacazes, v. 17, n. 3, p. 291-297, 2005.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Kidlington, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

WARDLAW, I. F. The control of carbon partitioning in plants. **New Phytologist**, London, v. 1, p. 341-381, 1990.

XIA, J. H.; SAGLIO, P. H. Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation of maize root tips to anoxia. **Plant Physiology**, Rochville, v. 100, n. 1, p. 40-46, 1992.