



DÉBORA DOMICIANO

**INTERAÇÃO ENTRE A ALTA CONCENTRAÇÃO DE
DIÓXIDO DE CARBONO E FERTIRRIGAÇÃO COM
NITRATO E AMÔNIO EM PLANTAS DE TABACO
(*Nicotiana tabacum* L.)**

LAVRAS - MG

2018

DÉBORA DOMICIANO

**INTERAÇÃO ENTRE A ALTA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO
E FERTIRRIGAÇÃO COM NITRATO E AMÔNIO EM PLANTAS DE TABACO**
(Nicotiana tabacum L.)

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

Orientadora

Dra. Fernanda Carlota Nery

Coorientadores:

Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori

Antonio Chalfun Júnior, PhD

Renato Paiva, PhD

LAVRAS - MG

2018

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

Domiciano, Débora .

Interação entre a alta concentração de dióxido de Carbono e fertirrigação com nitrato e amônio em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) : / Débora Domiciano. - 2018.

94 p. : il.

Orientador(a): Fernanda Carlota Nery.

Coorientador(a): Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori, Antonio Chalfun Junior, Renato Paiva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Assimilação de Nitrogênio. 2. Metabolismo do Carbono. 3. Aclimação fotossintética. I. Nery, Fernanda Carlota. II. Ribeiro Marchiori, Paulo Eduardo. III. Junior, Antonio Chalfun. IV. Paiva, Renato. V. Título.

DÉBORA DOMICIANO

**INTERAÇÃO ENTRE A ALTA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO
E FERTIRRIGAÇÃO COM NITRATO E AMÔNIO EM PLANTAS DE TABACO**
(Nicotiana tabacum L.)

**INTERACTION BETWEEN ELEVATED CARBON DIOXIDE CONCENTRATION
AND NITRATE AND AMMONIUM FERTILIZATION IN TOBACCO**
(Nicotiana tabacum L.)

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 Doutora.

Aprovada em 23 fevereiro de 2018.

Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ
Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori	UFLA
Dra. Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro	IF BAIANO
Antonio Chalfun Júnior, PhD	UFLA
Dra. Elka Fabiana Aparecida Almeida	UFMG

Orientadora

Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ

LAVRAS – MG

2018

Ao meu irmão Dênero Domiciano (*in memoriam*)
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por me amparar em todos os momentos, me dar forças para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

Aos meus pais, Ted e Tida, pela segurança de seus passos sempre guiando os meus, pela crença nos meus sonhos e pelo amor e educação que me deram e que fez com que esse momento fosse possível.

Aos meus avós Benedito e Vicentina pelo exemplo de amor incondicional.

A minha filha, Eloah, amor maior que inspira cada passo meu e ao meu companheiro, Vinícius, por estar ao meu lado na caminhada, me amparando com seu amor nos momentos difíceis e compreendendo as minhas ausências.

Ao meu marido Vinícius que não poupou esforços para que eu sempre tivesse um sorriso no rosto, que nos dias de fracasso enxugou minhas lágrimas e respeitou meus sentimentos.

Ao meu irmão Dê pelo exemplo de força e determinação, pelo carinho, ombro amigo e sabedoria de vida que tantas vezes inspirou minha caminhada. Meu amor por você cresce a cada dia junto com a saudade.

Ao meu irmão Alan, pelas risadas, conselhos, pela cumplicidade, e principalmente pela certeza de um porto seguro.

A Pollyanna Carvalho, pela amizade, por todas as coisas que me ensinou e por cada dia que passamos no laboratório juntas tornando esse trabalho possível.

A Débora Oliveira, pelo companheirismo, amizade incondicional, por ter sempre um sorriso no rosto, uma palavra amiga e solução para todos os problemas.

A Roseane Oliveira por ter sido a grande incentivadora dessa caminhada, pela amizade e por tudo que tem feito por mim.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade.

A minha orientadora Fernanda Carlota Nery por ter me acolhido no momento que mais precisei, pela amizade e principalmente por ter feito todo o possível para que eu sempre trabalhasse com entusiasmo.

Ao professor Luiz Edson Mota de Oliveira por me apresentar a “*metabolic net-work*”.

Ao professor Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori por toda sua contribuição em cada detalhe desta tese, pela prontidão em todos os momentos que precisei. Sem sua ajuda eu não teria conseguido!

Ao professor Antonio Chalfun Júnior, pelo exemplo de profissionalismo, por acreditar e tornar a realização desse trabalho possível.

Ao professor Renato Paiva pelos bons conselhos e por ter permitido que eu realizasse parte deste trabalho no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

Aos amigos Kamila Resende Dázio, Lucas Batista e Pedro Schumarcher pela amizade e apoio na realização das análises.

Aos funcionários Joel, Odorêncio, Barrinha e Salete do Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, pelo cuidado, carinho e amizade e assistência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!

*E disse Deus: Cubra-se a terra de vegetação: que as plantas deem sementes e árvores cujos frutos produzam sementes de acordo com as suas espécies.
E assim foi. A terra fez brotar a vegetação...; e Deus viu que ficou bom. (Gênesis 1:11,1)*

RESUMO GERAL

A estimulação inicial da assimilação de carbono (C) sob alta concentração de CO₂ ([CO₂]) é frequentemente seguida por um declínio em plantas C3 conhecido como aclimatação fotossintética ao CO₂. A diminuição da taxa fotossintética geralmente está associada a diminuição do conteúdo de Rubisco, acúmulo de amido e redução do teor de nitrogênio (N) endógeno. Essa redução do teor de N, ainda não foi completamente elucidada e pode estar relacionada a diferentes mecanismos fisiológicos. A absorção de NO₃⁻ consome cerca de 25% da energia produzida por uma folha expandida, enquanto o NH₄⁺ tem um menor requerimento energético para ser incorporado em compostos orgânicos. Essas necessidades energéticas distintas são extremamente relevantes sob alta [CO₂], uma vez que, com o aumento das taxas fotossintéticas, a assimilação de NO₃⁻ exigiria uma amplificação e flexibilidade dos sistemas de produção de energia para atender a alta demanda metabólica. Assim, as diferenças no requerimento energético entre as fontes inorgânicas de N, levam a hipótese de que o NH₄⁺ venha a se tornar uma fonte de N mais favorável a assimilação em plantas C3 diante do aumento da [CO₂] prevista para as próximas décadas. Contudo, níveis elevados de NH₄⁺ em tecidos vegetais podem ser tóxicos, causando alterações fisiológicas e morfológicas. Neste contexto, a seguinte hipótese foi investigada: o metabolismo do N, e sua relação com o metabolismo do C são diferentemente afetadas em plantas C3 fertilizadas com NO₃⁻ e/ou NH₄⁺ como fontes exclusivas de N e expostas a alta [CO₂]. Com a realização deste trabalho, o metabolismo do N e sua interação com o metabolismo do C foi analisado e discutido através dos resultados do experimento com plantas de tabaco (*N. tabacum*) fertirrigadas com NO₃⁻ e/ou NH₄⁺ e submetidas a diferentes [CO₂]. Os dados obtidos mostraram que as plantas que receberam apenas NO₃⁻ como fonte de N apresentaram baixo desempenho de crescimento quando expostas a [CO₂] de 760 μmol.mol⁻¹. Em contrapartida, nas plantas tratadas com NH₄⁺ como fonte de N, o aumento da [CO₂] favoreceu positivamente as trocas gasosas e a disponibilidade de esqueletos de Carbono (C), fundamentais para o funcionamento das vias metabólicas envolvidas na assimilação e distribuição de N para os tecidos em crescimento. Os resultados sugerem que o desempenho fisiológico de plantas de tabaco expostas a alta [CO₂] dependem das implicações metabólicas inerentes a fonte inorgânica de N que está sendo absorvida e assimilada.

Palavras-chave: Assimilação de Nitrogênio. Metabolismo do Carbono. Fotossíntese. Aclimatação fotossintética. Trocas gasosas.

GENERAL ABSTRACT

The initial stimulation of photosynthesis in elevated CO₂ concentration (e[CO₂]) is often followed by a photosynthesis decline, known as CO₂ acclimation. This phenomenon is typically promoted by a decrease in Rubisco content, an accumulation of starch and reduction in plant nitrogen (N) levels. Changes in N levels under e [CO₂] can be particularly affected if plants are fertilized with nitrate (NO₃⁻) or ammonium (NH₄⁺), as N sources. The NO₃⁻ assimilation consumes around 25% of energy produced by an expanded leaf, whereas NH₄⁺ needs a lower energetic requirement to be incorporated into organic compounds. These energetic needs are extremely relevant, once depending on the absorbed ion, associated to environmental condition, the cell energetic metabolism can be impacted in different ways. Thus, under e[CO₂], the increase in photosynthesis would require amplification and flexibility of the energy production systems to meet metabolic demand mainly during NO₃⁻ assimilation. In this context, some studies have pointed out the possibility of NH₄⁺ being a better N source to be absorbed and assimilated in C3 plants under e [CO₂]. However, high NH₄⁺ levels in plant tissues may be toxic, causing some physiological and morphological changes. Although plant N relations are important for food crops productivity and nutritional value worldwide, most studies do not compare plant performance supplied with different N sources. Therefore, this study aims to go beyond of treating N as a single entity — so-called total N soil or total N plant — because the specific N compounds formed from inorganic N available in soil subsequently become strongly engaged in all aspects of plant metabolism and determine plant responses to atmospheric e[CO₂]. For this, the suitability of different criteria to assess the plant N metabolism was analyzed and discussed through the experiment results with e[CO₂] and fertigation with NO₃⁻ and NH₄⁺ ratio in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. The results showed that plants that received only NO₃⁻ as source of N had low growth performance when exposed to [CO₂] of 760 μmol.mol⁻¹. On the other hand, in fertirrigated plants with only NH₄⁺, the increase [CO₂] positively favored the gas exchanges and availability of carbon skeletons. This was essential for maintenance of metabolic pathways responsible for N assimilation and distribution for growing tissues. These data show that the physiological performance of tobacco plants exposed to high [CO₂] depends on metabolic implications inherent to the inorganic N source being absorbed and assimilated.

Keywords: Nitrogen assimilation. Carbon metabolism. Photosynthesis. Photosynthetic acclimation. Gas exchange.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 <i>Nicotiana tabacum</i> como modelo	13
2.2 As plantas e o Nitrogênio	14
2.3 A absorção e assimilação de nitrato e amônio	16
2.4 Aspectos metabólicos da interação entre o metabolismo do Carbono e Nitrogênio.....	18
2.5 Metabolismo do Nitrogênio em plantas submetidas a alta concentração de dióxido de carbono.....	21
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
REFERÊNCIAS	25
SEGUNDA PARTE	34
ARTIGO 1 - A fertirrigação com nitrato ou amônio como fontes exclusivas de Nitrogênio, afeta diferencialmente o crescimento e o metabolismo de plantas de tabaco submetidas a alta concentração de dióxido de carbono.	34
RESUMO	35
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Cultivo das plantas e condições experimentais	37
2.2 Determinação da matéria seca e da taxa de crescimento relativo.....	39
2.3 Avaliações anatômicas	40
2.4 Quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides.....	40
2.5 Medições das trocas gasosas	41
2.6 Curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO ₂ no sítio de carboxilação	41
2.7 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	42
2.8 Quantificação de amido, sacarose, açúcares redutores, proteína e aminoácidos	43
2.9 Quantificação de amônio e nitrato endógeno.....	43
2.10 Atividade das isoformas de invertase	44
2.11 Atividade das enzimas do metabolismo do Nitrogênio	44
2.12 Atividade das enzimas antioxidantes, quantificação de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica	45
2.13 Delineamento Experimental	46
3 RESULTADOS	47
3.1 Determinação da matéria seca e da taxa de crescimento relativo.....	47
3.2 Avaliações anatômicas	49
3.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides.....	52
3.4 Medições das trocas gasosas	53
3.5 Curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO ₂ no sítio de carboxilação	57
3.6 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	57
3.7 Quantificação de amido, sacarose, açúcares redutores, proteína e aminoácidos	58
3.8 Quantificação de Nitrato e Amônio endógeno	64
3.9 Atividade das isoformas de invertase	65
3.10 Atividade das enzimas do metabolismo do Nitrogênio	67
3.11 Atividade das enzimas do metabolismo antioxidante, conteúdo de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica	71
4 DISCUSSÃO	77
5 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	86

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O nível atual de concentração de CO₂ [CO₂] atmosférico aumentou de 270 ppm no período da revolução pré-industrial (1840-1870) para 407 ppm observados em janeiro de 2018 (MLO, 2018), com estimativas de atingir entre 600 a 1000 ppm até o final do século XXI (IPCC, 2014). O aumento da [CO₂] aumenta a assimilação de Carbono (C) acelerando o crescimento de muitas espécies de plantas, especialmente quando outros recursos ambientais não limitam a produtividade (KANT et al., 2012).

A estimulação inicial da fotossíntese em resposta ao aumento da [CO₂] é frequentemente seguida por um declínio, que é tipicamente acompanhado por uma diminuição do conteúdo de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (SAGE et al., 1989), um acúmulo de carboidratos não estruturais (ARP et al., 1991), especialmente amido e uma diminuição da concentração de Nitrogênio (N) nos tecidos vegetais, indicando que a absorção e assimilação de N não acompanha a síntese de carboidratos e o acúmulo de biomassa (BLOOM, 2015; BLOOM et al., 2010, 2012; DEL POZO et al., 2007). Esse decréscimo no teor de N tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que a combinação entre alta [CO₂] e o decréscimo do teor de N nas plantas poderão afetar a produtividade e a qualidade nutricional dos alimentos, colocando em risco a segurança alimentar em todo o mundo (WEST et al., 2014).

O N é o elemento mineral mais limitante ao crescimento e a produtividade primária das plantas em sistemas naturais e agrícolas. As plantas geralmente adquirem N do solo nas formas de amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻) e o gerenciamento dessas formas é vital para a agricultura, uma vez que os íons NH₄⁺ e NO₃⁻ afetam as culturas de forma diferente (BLOOM, 1997). Durante a absorção, transporte, redução, e assimilação de NO₃⁻, aproximadamente 32 mols de fótons por mol de N são consumidos, enquanto que o custo energético para incorporação do NH₄⁺ em compostos orgânicos é de 9,45 mols de fótons por mol de N (RAVEN, 1985). Conseqüentemente, a assimilação de NO₃⁻ pode representar um dreno adicional de poder redutor, aumentando o consumo de NAD(P)H (BRÜCK; GUO, 2006).

Embora o NH₄⁺ tenha um menor requerimento energético (BLOOM, 1997), este íon pode ser tóxico quando acumulado em altas concentrações nos tecidos vegetais (COX; REISENAUER, 1973; KRONZUCKER et al., 2001). Por outro lado, o NO₃⁻ geralmente é a forma predominante disponível em solos agrícolas arejados e temperados (BLOOM, 1997)

podendo se acumular dentro dos tecidos das plantas em altas concentrações sem toxicidade (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013).

Apesar das diferenças bioquímicas significativas entre a absorção e assimilação de NO_3^- e NH_4^+ , a maioria dos estudos não compara os aspectos fisiológicos inerentes a cada uma dessas fontes de N. Além disso, o N muitas vezes é tratado como uma única entidade - o “N total”, desconsiderando a importância dos compostos nitrogenados específicos que são formados a partir da aquisição desses íons e que subsequentemente, se envolvem no metabolismo.

Diferentes mecanismos têm sido propostos para a diminuição da concentração de N sob alta $[\text{CO}_2]$, como por exemplo, a diluição do teor de N causado pelo rápido aumento da biomassa (TAUB; WANG, 2008), uma baixa regulação da síntese de Rubisco (GESCH et al., 1998), limitações na capacidade de absorção (BLOOM et al., 2012) e uma inibição direta da assimilação de NO_3^- (BLOOM et al., 2010). No entanto, embora alguns estudos tenham sido realizados nos últimos anos, pouco se sabe sobre como a absorção de NO_3^- ou NH_4^+ como fontes exclusivas de N, interagem com as vias metabólicas do C para determinar as respostas fisiológicas sob alta $[\text{CO}_2]$.

Diante do exposto, com a realização deste trabalho investigou-se a interação entre os metabolismos do C e N em plantas de tabaco fertilizadas com NO_3^- e/ou NH_4^+ como fontes exclusivas de N e expostas a diferentes $[\text{CO}_2]$. Os resultados foram analisados e discutidos explorando a forma de N disponível para absorção e assimilação como um componente intrínseco das respostas fisiológicas de plantas C3 a alta $[\text{CO}_2]$.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Nicotiana tabacum* como modelo

A espécie *Nicotiana tabacum* pertence ao gênero *Nicotiana* L., leva o nome de Jean Nicot de Villemain, a primeira pessoa a importar essas plantas das Américas para a Europa em 1560. O termo “*Nicotiana*” foi originalmente usado por Adam Lonitzer para descrever plantas de tabaco em 1630 e em 1788 por Carl von Linné (Linnaeus) para designar todo o gênero (SIERRO et al., 2014). Existem mais de 75 espécies naturais de *Nicotiana*, incluindo 49 nativas do continente Americano e 25 nativas da Austrália (CHASE et al., 2003). A maioria dos tabacos comerciais cultivados hoje pertence à espécie *Nicotiana tabacum* L., abrangendo mais de 1.600 cultivares (SIERRO et al., 2014), sendo considerada uma das culturas não alimentares mais cultivadas em todo o mundo (BARLA; KUMAR, 2016). Seu produto comercial é obtido a partir das folhas e consumido como uma droga recreativa.

O tabaco é uma planta do tipo fotossintético C3, onde mesofilo foliar é o tecido de maior atividade fotossintética possui muitos cloroplastos e clorofilas, pigmentos especializados na absorção de luz. O processo fotossintético compreende duas etapas acopladas. A primeira de caráter fotoquímico, tem a função de converter energia luminosa em energia química (ATP e NADPH). A segunda etapa, de caráter bioquímico, em que o CO₂ é fixado pela enzima Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e reduzido a compostos orgânicos (açúcares). Esse processo é conhecido como Ciclo de Calvin-Benson ou via assimilatória C3, devido à produção do primeiro produto fotossintético ser um composto orgânico de três carbonos, denominado 3-fosfoglicerato (3-PGA) (BUCHANAN et al., 2015). A taxa de fixação de CO₂, realizada pela ação carboxilase da enzima Rubisco, pode ser reduzida em função da sua atividade oxigenase através de um processo conhecido como fotorrespiração. Em plantas de tabaco a fotorrespiração influencia uma ampla gama de processos bioenergéticos, como por exemplo o funcionamento do Fotossistema II (HUANG; HU; ZHANG, 2015), o metabolismo do carbono (CHAVES; PANTSCHITZ; SCHULZE, 2001) e Nitrogênio (N) (DUTILLEUL et al., 2005; VINCENTZ et al., 1993).

As pesquisas com tabaco contribuíram grandemente para o avanço do conhecimento sobre aspectos metabólicos das plantas. Em 1930 o tabaco foi usado como modelo na análise das necessidades de nutricionais e, em 1940, o isótopo ¹⁵N, foi utilizado pela primeira vez para pesquisar a absorção e a assimilação de Nitrogênio (N) estabelecendo que nessas plantas, a redução do NO₃⁻ ocorre principalmente nas células fotossinteticamente ativas (LINDBLAD & GUERRERO, 1993). Essas e muitas outras descobertas científicas que parecem "senso comum"

atualmente, são derivadas de pesquisas realizadas com tabaco. Além disso, o tabaco é alvo para o projeto de sequenciamento SOL-100 (FERNANDEZ-POZO et al., 2015), que tem como objetivo decifrar os genomas das mais importantes espécies de Solanaceae.

A escolha do tabaco como modelo para a realização desse trabalho, considerou a acessibilidade a informações funcionais sobre seus aspectos fisiológicos.

2.2 As plantas e o Nitrogênio

O Nitrogênio (N) é macronutriente mais limitante para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Cerca de 20 a 50 g de N são necessários para produzir 1 kg de massa seca (XU; FAN; MILLER, 2012). Na célula, está presente como constituinte de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, coenzimas, vitaminas, clorofilas, hormônios e grupos funcionais de enzimas participando assim, de algumas das reações mais intensivas em energia na biosfera (BLOOM, 2015). A deficiência deste elemento é o distúrbio nutricional que mais afeta os rendimentos das culturas em todo o mundo (FAGERIA; BALIGAR, 2005).

A disponibilidade de nitrogênio no solo pode variar consideravelmente tanto no espaço quanto no tempo devido a fatores como precipitação, temperatura, vento, tipo de solo e pH (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Portanto, a forma preferida em que N é absorvida depende da adaptação da planta a essas condições. Geralmente, as plantas adaptadas ao baixo pH dos solos, encontradas em florestas maduras ou tundra ártica, tendem a absorver amônio (NH_4^+) ou aminoácidos, enquanto plantas adaptadas a um pH mais alto e solos aeróbicos absorvem preferencialmente nitrato (NO_3^-) (MAATHUIS, 2009).

A rizosfera a partir da qual as plantas extraem essas formas N é altamente heterogênea, tanto espacial quanto temporalmente. As próprias raízes da planta modificam seus ambientes pelo esgotamento de nutrientes, que culmina com a alteração do pH da rizosfera através da troca iônica, ou ainda, pela relação simbiótica com microrganismos do solo (SMART; BLOOM, 1998; TAYLOR; BLOOM, 1998)

Embora as fontes naturais possam ser significativas para os níveis de N disponíveis as plantas, cerca de 85 a 90 milhões de toneladas de adubos nitrogenados são adicionados anualmente ao solo na forma dos íons NO_3^- e NH_4^+ (GOOD; SHRAWAT; MUENCH, 2004) para atender às necessidades das variedades de culturas, tornando-se a principal contribuição para o aumento da produtividade (TILMAN et al., 2002). Porém, a natureza dinâmica do N e sua propensão à perda nos sistemas solo-planta criam um ambiente único e desafiador para o gerenciamento eficiente da fertilização, consistindo em uma importante fonte de poluição para

os ecossistemas de água doce e costeira, principalmente através da lixiviação de NO_3^- (CARPENTER et al., 1998). Além disso, a aplicação mal direcionada de fertilizantes nitrogenados gera problemas econômicos e sociais, uma vez que o N é um dos nutrientes que mais elevam os custos da produção, colaborando para o aumento da desigualdade de distribuição de recursos alimentares principalmente nos países em desenvolvimento (LAWLOR, 2002). Isso se torna mais grave diante de uma cenário crescente da população mundial e das mudanças climáticas globais previstas para o próximo século (HUNGATE, 2003).

Diante disso, um dos desafios da atualidade, tem sido melhorar a eficiência do uso do N (EUN), sem que haja excesso ou deficiência desse elemento, otimizando a integração entre a produtividade, o lucro, a proteção ambiental (CASSMAN; DOBERMANN; WALTERS, 2002) e a qualidade nutricional dos alimentos (WEST et al., 2014)

A EUN foi inicialmente definida como a produtividade de massa seca por unidade N absorvido do solo (HIROSE, 2011). No entanto, há uma complexidade significativa na relação entre o N e as plantas, sendo necessário levar em consideração a eficiência de utilização do N absorvido e seu efeito na área foliar da cultura, na absorção de luz, na fotossíntese, no crescimento, no particionamento de biomassa e produtividade (FAGERIA; BALIGAR, 2005). Além disso, a EUN é um processo sujeito a diferentes fontes de variação que podem coexistir, onde o genótipo desempenha um papel primário devido as diferenças nas características morfológicas e fisiológicas de cada espécie ou cultivar (SCHENK, 2006; THORUP-KRISTENSEN; SØRENSEN, 1999). Embora o mesmo genótipo possa demonstrar diferente EUN quando submetido a diferentes níveis de disponibilidade ou fontes específicas de N (BLOOM, 2015; BURNS, 2006), fatores ambientais (temperatura, precipitação e estrutura do solo, etc.), manejo e estresses bióticos e abióticos também afetam a EUN por influenciar diretamente o crescimento e o desenvolvimento da cultura ou a disponibilidade de N do solo.

Apesar de ser um assunto extensivamente estudado, a complexidade da interação entre as plantas e o N ainda apresenta muitos desafios aos pesquisadores. A compreensão holística dessa interação será fundamental para melhorar a forma como as plantas absorvem, utilizam e distribuem o N disponível, principalmente diante da estimulação fotossintética como consequência do aumento da $[\text{CO}_2]$ atmosférica previstas para as próximas décadas (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013; CHEN et al., 2013).

2.3 A absorção e assimilação de nitrato e amônio

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, da atividade das enzimas envolvidas no ciclo e da disponibilidade de energia para o processo de assimilação (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

Tanto o íon NO_3^- , quanto o NH_4^+ estão presentes no solo, onde as raízes das plantas podem absorver uma dessas fontes (ou ambas) usando sistemas de transporte de baixa e alta afinidade. A absorção e a translocação de NO_3^- são predominantemente mediadas pela família de transportadores NRT e CLC (transportador/canal de cloreto) (KRAISER et al., 2011; KRAPP, 2015; WANG; HSU; TSAY, 2012). Os transportadores NRT1 e NRT2 de *Arabidopsis thaliana* são conhecidos pelo transporte de NO_3^- de baixa afinidade (LATS) e alta afinidade (HATS), saturando-se na ordem de mM e μM respectivamente (WANG; HSU; TSAY, 2012). Assim como o NO_3^- , a absorção de NH_4^+ é igualmente dirigida por LATS (AMT2) e HATS (AMT1) (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Quando as concentrações externas de NH_4^+ são altas, o influxo de NH_4^+ pelas raízes também pode ser facilitado por Aquaporinas (AQP/TIP), canais de potássio (KIRC) e canais de cátions não seletivos (NSCC) (BRITTO; KRONZUCKER, 2006).

As plantas utilizam esses sistemas de absorção contrastantes quando o conteúdo de N do solo é baixo (HATS) ou suficiente (LATS), a fim de maximizar o crescimento tanto em condições ótimas como limitantes. Neste ponto, há uma dicotomia entre as fontes de N disponíveis na medida em que a rizosfera se torna alcalinizada pela absorção de quantidades elevadas de NO_3^- , ou acidificada como resultado de altas concentrações externas de NH_4^+ . A alcalinização ativa transportadores HATS de NH_4^+ , enquanto a acidificação ativa transportadores HATS de NO_3^- (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Essa regulamentação da absorção é fundamental para evitar a toxicidade causada por altas concentrações NH_4^+ , além de facilitar a absorção de ambos os íons, fazendo com que atuem sinergicamente para promover o crescimento e a produtividade das plantas (HACHIYA et al., 2012).

O equilíbrio entre a fertilização com NO_3^- e NH_4^+ merece atenção renovada, principalmente porque as previsões futuras de mudanças climáticas, podem afetar tanto a disponibilidade, como também a preferência da planta por uma dessas formas de N no solo (BLOOM, 2010).

Após a absorção pela planta, NO_3^- e NH_4^+ precisam ser incorporados na forma orgânica (assimilado) para síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, clorofilas, ácidos nucleicos, coenzimas, hormônios vegetais, alcaloides e outras moléculas que desempenham papel importante no metabolismo vegetal (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

O NO_3^- absorvido pode ser armazenado temporariamente em vacúolos, assimilado nas raízes, na parte aérea, ou em ambos os locais dependendo da espécie e da disponibilidade de energia (FORDE, 2002). A redução do NO_3^- ocorre no citoplasma e é catalisada pela enzima redutase do nitrato (RN) para formação de nitrito (NO_2^-). A ação desta enzima é intensiva em energia, requerendo uma molécula de NAD(P)H por molécula de NO_3^- reduzida (CAMPBELL, 1999). Estudos têm mostrado que a atividade da RN é positivamente regulada pela presença de NO_3^- , luz e o estado de C da planta (principalmente presença de glicose) (KLEIN et al., 2000), ao passo que NH_4^+ , glutamato (Glu) e glutamina (Gln) podem atuar como reguladores negativos de sua atividade (CAMPBELL, 1999).

O NO_2^- sintetizado como resultado da atividade da RN pode ser transportado para plastídios e reduzido a NH_4^+ à custa de moléculas de ferredoxina reduzida (Fdred) (folha) ou NAD(P)H (raízes), por meio da atividade da enzima nitrito redutase (NiR). A redução de NO_2^- requer seis mols de elétrons por mol de NO_2^- , o que representa 75% dos elétrons consumidos durante a assimilação de NO_3^- (BLOOM; SUKRAPANNA; WARNER, 1992). O NO_3^- é então, em última instância, reduzido a NH_4^+ (LAM et al., 1995).

O NH_4^+ presente nos tecidos vegetais pode originar da redução do NO_3^- , da absorção direta de NH_4^+ , da desaminação de compostos nitrogenados, ou ainda como subproduto da fotorrespiração (KANT et al., 2007). A incorporação deste íon em diferentes aminoácidos (AA) é feita geralmente através do ciclo glutamina sintetase/glutamina 2-oxoglutarato amino transferase (GS/GOGAT) que ocorre em cloroplastos (folhas) ou plastídios (raiz). A atividade da GS depende de ATP como fonte de energia e requer NH_4^+ e glutamato (Glu) como substrato para produção de glutamina (Gln). A Gln recém-sintetizada é então usada para síntese de AA, transportada para outros órgãos, ou pode prosseguir na assimilação de N através da atividade da enzima GOGAT, que requer Fdred (folha) ou NAD(P)H (raiz) como fonte de energia para transferência de um grupo amina da Gln para ácido dicarboxílico 2-oxoglutarato (2-OG), produzindo duas moléculas de Glu. Uma molécula de Glu pode ser novamente incorporada a via GS/GOGAT para prosseguir na assimilação de N, e a segunda pode ser usada para produção de outros compostos nitrogenados em diferentes compartimentos celulares (KRAPP, 2015).

O transporte de Glu do cloroplasto para o citosol é realizado pelo transportador 2-OG/malato (DIT1/2) (PICAULT et al., 2002; RIEBESEEL et al., 2009) e depende da

disponibilidade de esqueletos de carbono. No citosol, o Glu pode então servir como doador de seu grupo amina ao oxalacetato (OAA) através da atividade da enzima aspartato amino transferase (AspAT) para produção aspartato (Asp) e 2-OG como subproduto. O 2-OG pode ser transportado de volta ao cloroplasto para continuar a produção Glu, enquanto N é armazenado como Asp ou metabolizado ao aminoácido asparagina (Asn) rico em N, pela enzima asparagina sintase (AS) (KRAPP, 2015). A Asn, pode ser transportada para tecidos deficientes em N ou para parte aérea em plantas que assimilam NH_4^+ preferencialmente nas raízes. Este ciclo é vital quando o NH_4^+ está presente em altas concentrações, pois é capaz de processá-lo em uma forma utilizável, evitando sintomas de toxicidade de NH_4^+ , além de atender a demanda de N da planta. No entanto, essa estratégia também demanda energia na forma de ATP e há limites para o quanto o Asn pode ser diretamente armazenado e/ou enviado para outros tecidos (WILLIAMS; MILLER, 2001).

A síntese de Glu em tecidos vegetais também pode ser realizada através de uma rota alternativa, onde a enzima glutamato desidrogenase (GDH) localizada nas mitocôndrias das células companheiras do floema e no citosol de órgãos senescentes ou tecidos. A GDH é responsável pela catálise reversível da aminação do 2-OG (DUBOIS et al., 2003). É importante ressaltar que esta enzima possui alto K_m (7,4) para o NH_4^+ , favorecendo a síntese de Glu apenas quando a concentração deste íon é alta (>1 mM). Quando a concentração de NH_4^+ é menor, sua incorporação ao Glu ocorre principalmente via GS-GOGAT (TERCE-LAFORGUE et al., 2013).

2.4 Aspectos metabólicos da interação entre o metabolismo do Carbono e Nitrogênio

Por sua natureza autotrófica, o crescimento e o desenvolvimento de todas as espécies de plantas está inerentemente ligado à presença, ou ausência, da luz solar como fonte de energia. O resultado disso é que os processos metabólicos se ajustam direta ou indiretamente com o ritmo circadiano e a assimilação de N não é uma exceção (ALBORNOZ; LIETH, 2015; KRAPP et al., 2011).

A assimilação de N é um dos processos metabólicos que mais demandam energia (BLOOM, 2015). Para obter elétrons suficientes, as plantas coordenam a assimilação de N com outros processos intensivos em fluxos energéticos como forma de maximizar sua eficiência (ARMENGAUD et al., 2009; SCHEIBLE et al., 2004; STITT et al., 2002). Dentre esses processos estão a etapa fotoquímica da fotossíntese, responsável pela conversão de energia luminosa em energia química armazenada em compostos reduzidos e o Ciclo Calvin-Benson

(CBC) que envolve uma série de reações bioquímicas responsáveis pela assimilação de C. O CBC ocorre no estroma do cloroplasto e estima-se que consuma cerca de 50% do poder redutor gerado pela cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto (CET_C) (DANI et al., 2014; NOCTOR; FOYER, 1998). Em contraste com o CBC, a assimilação de N a partir de NO₃⁻ ocorre gradualmente no citosol e cloroplasto, consumindo aproximadamente 25% do poder redutor gerado pela CET_C (DANI et al., 2014; NOCTOR; FOYER, 1998). Assim, a energia derivada do complexo antena durante a captura de luz solar sustenta diretamente os processos de assimilação de N, ou indiretamente através da síntese de moléculas que transportam energia para serem usadas posteriormente (STITT et al., 2002).

A assimilação N também depende da produção de esqueletos de C. Isso significa que, a disponibilidade de açúcares produzidos através do CBC, influenciará o processo assimilatório. À medida que os açúcares se acumulam ao longo do dia, são direcionados para oxidação via glicólise e o funcionamento (mesmo que parcial) do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), permitindo a síntese de 2-OG na mitocôndria que será usado como substrato pela GOGAT (STITT et al., 2002). No entanto, a acumulação de açúcares em níveis suficientemente altos para exceder a capacidade de oxidação, ativará um mecanismo de *feedback* negativo, resultando em queda na capacidade fotossintética (STITT et al., 2002). Esse processo propicia uma acumulação de NADPH nos cloroplastos, suplantando a capacidade da enzima ferredoxina-NADP redutase (FNR) em utilizar o NADP como substrato. O consquente aumento na concentração de Fdred é benéfico à atividade da NiR que possui alto K_m (0,6 μM) para Fdred, além de favorecer a atividade da GOGAT (BACKHAUSEN, 2000; BLOOM et al., 2014). Quando esses requisitos metabólicos complexos são atendidos, o resultado é a produção de Glu.

A interação entre o N e o C fotossintético em folhas de espécies C3 é adicionalmente influenciado pela operação da via fotorrespiratória (MISRA, 2014). A fotorrespiração é uma consequência da dupla afinidade da enzima Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) tanto para o oxigênio como para o CO₂ (BAUWE; HAGEMANN; FERNIE, 2010). O produto da reação oxigenase da Rubisco é o 2-fosfoglicolato (2PG), que é tóxico quando acumulado em níveis elevados dentro do cloroplasto. O 2-PG precisa então ser reciclado para 3-fosfoglicerato (3PGA) através de um processo que requer pelo menos 16 enzimas distribuídas em quatro compartimentos celulares (cloroplasto, mitocôndria, peroxissomo e citosol) (TIMM et al., 2008) e pela operação de diferentes transportadores de metabólitos (REUMANN; WEBER, 2006; SCHWACKE, 2003). A finalidade da via fotorrespiratória é, em última instância, recuperar uma molécula de 3PGA a partir de duas moléculas de 2PG, enquanto um CO₂ e uma molécula de NH₄⁺ são liberados pelo complexo glicina descarboxilase (GDC)

durante a conversão de duas moléculas de glicina em uma molécula de serina na mitocôndria (ZHU; LONG; ORT, 2008). Este processo é conhecido por reduzir a eficiência fotossintética, uma vez que o CO_2 e o NH_4^+ liberados precisam ser reassimilados pela Rubisco e através do ciclo GS/GOGAT respectivamente, com gasto de poder redutor e ATP.

Apesar de reduzir a eficiência energética da fotossíntese, a fotorrespiração pode proteger contra a fotoinibição em condições em que a assimilação de CO_2 é limitada, no entanto, gerando um alto fluxo NH_4^+ (KEYS, 2006), a taxas que excedem em até 10 vezes o NH_4^+ gerado pela assimilação primária de N (NUNES-NESI; FERNIE; STITT, 2010; RACHMILEVITCH; COUSINS; BLOOM, 2004). Esse aumento na concentração celular de NH_4^+ favorece a atividade da enzima GDH no sentido de síntese de Glu e sua operação em conjunto a GS, pode aliviar possíveis sintomas de toxidez (STTIT et al., 2002).

A redução da fotorrespiração por engenharia genética, tem sido objeto de estudos de cientistas na tentativa de melhorar a fixação de C e consequentemente a produtividade das principais culturas alimentícias C3 (BETTI et al., 2016; PETERHANSEL et al., 2013). Em contrapartida, em uma abordagem heurística das etapas metabólicas, Misra (2014) propõe uma nova rede de operação do ciclo fotorrespiratório, que permitiria o desvio de metabolitos (ex. glicina, serina e Glu) da rota fotorrespiratória cíclica em quantidades consideráveis. O desvio desses AA é especialmente importante em folhas completamente expandidas e senescentes de onde C e N são remobilizados e exportados para tecidos drenos em crescimento. Neste sentido, o ciclo fotorrespiratório como um importante componente do metabolismo do N em plantas C3 é corroborado.

Como visto, o crescimento e desenvolvimento das plantas são altamente dependentes da interação entre metabolismo do C e N. Como grandes quantidades de N são investidas na maquinaria fotossintética, consequentemente a assimilação de CO_2 e a produção de biomassa requer um fornecimento adequado desse nutriente. Como tal, a disponibilidade de N é claramente determinante da capacidade fotossintética e do rendimento das culturas (NUNES-NESI; FERNIE; STITT, 2010). O controle eficaz deste sistema é mantido por interações metabólicas complexas, que são reguladas em diferentes níveis, a compreensão dessas interações é extremamente importante, principalmente quando se deseja avaliar o desempenho do vegetal em diferentes condições ambientais.

2.5 Metabolismo do Nitrogênio em plantas submetidas a alta concentração de dióxido de carbono

O nível atual de CO₂ atmosférico aumentou de 270 ppm no período da revolução pré-industrial (1840-1870) para 407 ppm observados em janeiro de 2018 (MLO, 2018), com estimativas de atingir entre 600 a 1000 ppm até o final do século XXI (IPCC, 2014). Para as plantas C3, o aumento na fonte primária de C, aumenta a taxa fotossintética e o acúmulo de biomassa (POORTER; NAGEL, 2000). Essa estimulação da fotossíntese é atribuída principalmente a mudanças na concentração de CO₂/concentração de Oxigênio (O₂) nas proximidades do sítio ativo da Rubisco (LONG et al., 2004), aumentando a taxa carboxilação em relação à oxigenação da RuBP e conseqüentemente diminuindo a fotorrespiração (BAUWE; HAGEMANN; FERNIE, 2010). No entanto, esse efeito diminui em dias a anos (dependendo da espécie) e é conhecido como aclimação fotossintética a alta [CO₂], onde a estimulação inicial da fixação de C é seguida por uma reversão parcial ou estabilização (KANT et al., 2012).

Estudos têm relacionado a aclimação fotossintética a alta [CO₂] a diferentes fatores, como por exemplo: a diminuição no conteúdo de Rubisco em resposta a maior eficiência de uso do N (LONG et al., 2004); a inibição da assimilação fotossintética de C em consequência da acumulação de carboidratos não estruturais ocasionado pelo desequilíbrio entre fonte e dreno (ARP et al., 1991; KITAOKA et al., 2016; LONG et al., 2004); e ainda, uma redução no teor de proteína e N total da planta (BAHRAMI et al., 2017; BLOOM et al., 2014; RUIZ-VERA et al., 2017).

Apesar dos mecanismos pelos quais ocorre a diminuição do teor de N quando as plantas são expostas a alta [CO₂] ainda não terem sido completamente elucidados, muitas hipóteses têm avançado na tentativa de explicar esse fenômeno. Uma delas é a diluição do conteúdo de N causada pelo rápido incremento da biomassa (GIFFORD; BARRETT; LUTZE, 2000; KANT et al., 2012; KUEHNY et al., 1991; WONG, 1990). Os trabalhos que sustentam essa hipótese não discriminam entre uma diluição de N total, ou uma diluição funcional, como consequência, a precisão que o processo descreve é incerta.

Um dos efeitos mais consistentes do crescimento de plantas C3 em alta [CO₂] é a diminuição da condutância estomática (g_s) (AINSWORTH; ROGERS, 2007; NORBY et al., 1999). Menores valores de g_s levaria a uma diminuição da taxa transpiratória e conseqüentemente da absorção de nutrientes para os quais o fluxo de massa através do solo desempenha um papel importante, incluindo N principalmente na forma de NO₃⁻ (TAUB; WANG, 2008). A absorção de N ainda pode ser dificultada pelo aumento de raízes laterais

versus primárias, o que levaria a uma queda na eficiência da absorção de N pela limitação na exploração do solo (BERNTSON; BAZZAZ, 1995; LYNCH; ST.CLAIR, 2004; PRITCHARD; ROGERS, 2000).

Embora a absorção represente um passo crucial na aquisição de N pelas plantas, é a assimilação que define como o N adquirido vai integrar diferentes componentes do metabolismo celular. Neste contexto, estudos sugerem que a alta $[CO_2]$ altera a eficiência de absorção de NO_3^- (BLOOM et al., 2010; RACHMILEVITCH; COUSINS; BLOOM, 2004). Bloom et al., 2010 monitoraram a aquisição de NO_3^- em *Triticum aestivum* e *Arabidopsis thaliana*, concluindo que tanto a absorção quanto a assimilação foram comprometidas em ambas as espécies sob alta $[CO_2]$. Bloom et al., 2014 expandiram esta hipótese demonstrando que o teor de proteína e, portanto, o valor nutricional do grão de *T. aestivum* foi diminuída quando NO_3^- era fornecido como principal fonte de N sob alta $[CO_2]$.

Um dos mecanismos para explicar a inibição da assimilação de NO_3^- sob alta $[CO_2]$ é o acúmulo de ácido carbônico (HCO_3^-), que em última instância, poderia competir com o transporte de NO_2^- em cloroplastos através de transportadores *NarI* (MAEDA et al., 2014). Outro mecanismo seria a competição por Fdred no estroma do cloroplasto, uma vez que a enzima FNR tem maior afinidade por Fdred do que a NiR (KNAFF, 1996) e a assimilação de NO_3^- prossegue apenas se a disponibilidade de Fdred exceder a necessária para a formação de NADPH (BACKHAUSEN, 2000; BLOOM et al., 2010). Para a maioria das plantas, isso ocorre quando a disponibilidade de CO_2 limita a fixação de carbono em plantas C3 (BLOOM et al., 2010). Um terceiro mecanismo envolve a fotorrespiração. Várias linhas de evidência ligam a fotorrespiração com a assimilação de NO_3^- na folha de plantas C3: a fotorrespiração estimula a exportação do malato que é reduzido na mitocôndria pelo NADH gerado na descarboxilação da glicina (BACKHAUSEN, 2000; BLOOM et al., 2014; TANIGUCHI; MIYAKE, 2012; VOSS et al., 2013), a oxidação do malato no citosol gera NADH (IGAMBERDIEV et al., 2001) que é usado como substrato pela RN (RATHNAM, 1978). Assim, a supressão da fotorrespiração em folhas de plantas C3 submetidas a alta $[CO_2]$ pode diminuir a assimilação de NO_3^- , por uma menor disponibilidade de energia na forma poder redutor no citosol, prejudicando a atividade da RN.

Ainda estamos longe de compreender como a $[CO_2]$ prevista para as próximas décadas irá influenciar metabolismo do N em plantas C3. De fato, algumas conclusões tiradas de Bloom et al., 2010 sugerem que o NH_4^+ poderia se tornar uma fonte de N mais favorável que o NO_3^- no futuro. Embora controversa, é uma questão que merece maiores investigações. Primeiro porque as proporções de NO_3^- e NH_4^+ dos fertilizantes nitrogenados foram estabelecidas durante

as pesquisas que impulsionaram a “Revolução Verde” entre 1940 e 1970. Nessa época a [CO₂] atmosférico era de aproximadamente 310 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, bem abaixo dos 407 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ registrados em janeiro de 2018 (MLO, 2018). Segundo, porque as alterações no teor de N ocasionadas pela alta [CO₂] afetam tanto a produtividade quanto o valor nutricional das principais culturas alimentícias, significando um retrocesso para a agricultura mundial.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do aumento progressivo da $[\text{CO}_2]$ atmosférica e da necessidade de alimentar adequadamente uma população mundial crescente, a melhoria simultânea das eficiências de utilização C e N pelas plantas é de extrema importância. Embora o crescimento da planta seja normalmente estimulado sob alta $[\text{CO}_2]$, a aquisição de biomassa não é mantida ao longo do tempo devido a diminuição progressiva das taxas fotossintéticas. Isso ocorre principalmente porque a aquisição de N pelas plantas não acompanha o rápido acúmulo de matéria seca. Muitos estudos apontam que à medida que as concentrações atmosféricas de CO_2 aumentam, a assimilação NO_3^- diminui, levando a uma diminuição de compostos orgânicos nitrogenados, inclusive de proteínas. Tem sido sugerido que o aumento da absorção de NH_4^+ poderia compensar a baixa assimilação de NO_3^- , no entanto, isso exigiria a compreensão de como a toxicidade NH_4^+ pode ser superada. Para abordar estas questões, é fundamental que novos estudos sobre a assimilação de NH_4^+ e NO_3^- forneçam informações sobre como as diferenças bioquímicas inerentes ao metabolismo de cada um desses íons interagem e são influenciadas pela assimilação de C determinando o crescimento de plantas submetidas a alta $[\text{CO}_2]$.

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 3, p. 258–270, 2007.

ALBORNOZ, F.; LIETH, J. H. Diurnal macronutrients uptake patterns by lettuce roots under various light and temperature levels. **Journal of Plant Nutrition**, v. 38, n. 13, p. 2028–2043, 2015.

ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which Nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, v. 163, n. 2, p. 174–199, 2013.

ARMENGAUD, P. et al. Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of Potassium nutrition for glycolysis and Nitrogen assimilation in *Arabidopsis* roots. **Plant Physiology**, v. 150, n. 2, p. 772–785, 2009.

ARP, W. J. Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. **Plant, Cell & Environment**, v. 14, n. 8, p. 869-875, 1991.

BACKHAUSEN, J. E. Electron acceptors in isolated intact spinach chloroplasts act hierarchically to prevent over-reduction and competition for electrons. **Photosynthesis Research**, v. 64, n. 1, p. 1–13, 2000.

BAHRAMI, H. et al. The proportion of nitrate in leaf Nitrogen, but not changes in root growth, are associated with decreased grain protein in wheat under elevated [CO₂]. **Journal of Plant Physiology**, v. 216, p. 44–51, 2017.

BARLA, F. G.; KUMAR, S. Tobacco biomass as a source of advanced biofuels. **Biofuels**, p. 1–12, 2016.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; FERNIE, A. R. Photorespiration: players, partners and origin. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 6, p. 330–6, 2010.

BERNTSON, G. M.; BAZZAZ, F. A. Belowground positive and negative feedbacks on CO₂ growth enhancement. **Plant and Soil**, v. 187, n. 2, p. 119–131, 1995.

- BETTI, M. et al. Manipulating photorespiration to increase plant productivity: recent advances and perspectives for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 10, p. 2977–88, 2016.
- BLOOM, A. J. et al. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 899–903, 2010.
- BLOOM, A. J. et al. CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C3 but not C4 plants and slows growth under nitrate in C3 plants. **Ecology**, v. 93, n. 2, p. 355–367, 2012.
- BLOOM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant Nitrogen sources. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 10–16, 2015.
- BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1294–301, 1992.
- BLOOM, J. A. Nitrogen as a limiting factor: crop acquisition of ammonium and nitrate. In: ACADEMIC PRESS (Ed.). **Agricultural Ecology**. Jackson L. ed. San Diego California: [s.n.]. p. 145–172.
- BLOOM, J. A. et al. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. **Nature Climate Change**, v. 4, n. 6, p. 477–480, 2014.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do Nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.
- BRITTO, D.; KRONZUCKER, H. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 11, p. 529–534, 2006.
- BRÜCK, H.; GUO, S. Influence of N form on growth photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* L. plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 169, n. 6, p. 849–856, 2006.
- BURNS, L. G. Assessing N fertiliser requirements and the reliability of different recommendation systems. **Acta Horticulturae**, n. 700, p. 35–48, 2006.
- CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 277–303, 1999.

CARPENTER, S. R. et al. Nonpoint pollution of surface waters with Phosphorus and Nitrogen. **Ecological Applications**, v. 8, n. 3, p. 559–568, 1998.

CASSMAN, K. G.; DOBERMANN, A.; WALTERS, D. T. Agroecosystems, Nitrogen-use efficiency, and Nitrogen management. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 31, n. 2, p. 132–140, 2002.

CHASE, M. W. et al. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). **Annals of botany**, v. 92, n. 1, p. 107–27, 2003.

CHAVES, M. M.; PANTSCHITZ, E.; SCHULZE, E.-D. Growth and photosynthetic Carbon metabolism in tobacco plants under an oscillating CO₂ concentration in the atmosphere. **Plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 417–425, 2001.

CHEN, G. et al. Nitrogen use efficiency (NUE) in rice links to NH₄⁺ toxicity and futile NH₄⁺ cycling in roots. **Plant and Soil**, v. 369, n. 1–2, p. 351–363, 2013.

COX, W. J.; REISENAUER, H. M. Growth and ion uptake by wheat supplied Nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. **Plant and Soil**, v. 38, n. 2, p. 363–380, 1973.

DANI, K. G. S. et al. Increased ratio of electron transport to net assimilation rate supports elevated isoprenoid emission rate in eucalypts under drought. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 1059–1072, 2014.

DEL POZO, A. et al. Gas exchange acclimation to elevated CO₂ in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to Nitrogen acquisition and partitioning in wheat grown in field chambers. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 371–380, 2007.

DUTILLEUL, C. et al. Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate assimilation and the integration of Carbon and Nitrogen metabolism. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 64–78, 2005.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing Nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, v. 88, n. 1, p. 97–185, 2005.

FERNANDEZ-POZO, N. et al. The Sol Genomics Network (SGN)--from genotype to phenotype to breeding. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D1036–D1041, 2015.

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

GIFFORD, R. M.; BARRETT, D. J.; LUTZE, J. L. The effects of elevated [CO₂] on the C:N and C:P mass ratios of plant tissues. **Plant and Soil**, v. 224, n. 1, p. 1–14, 2000.

GESCH, R. W. et al. Changes in growth CO₂ result in rapid adjustments of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit gene expression in expanding and mature leaves of rice. **Plant Physiology**, v. 118, n. 2, p. 521–529, 1998.

GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 12, p. 597–605, 2004.

HACHIYA, T. et al. Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 3, p. 577–591, 2012.

HELDT, H.-W.; HELDT, F. In the photorespiratory pathway phosphoglycolate formed by the oxygenase activity of Rubisco is recycled. In: **Plant Biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 195–211.

HIROSE, T. Nitrogen use efficiency revisited. **Oecologia**, v. 166, n. 4, p. 863–867, 26 2011.

HUANG, W.; HU, H.; ZHANG, S.-B. Photorespiration plays an important role in the regulation of photosynthetic electron flow under fluctuating light in tobacco plants grown under full sunlight. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

HUNGATE, B. A. ATMOSPHERIC SCIENCE: Nitrogen and climate change. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1512–1513, 2003.

IGAMBERDIEV, A. U. et al. The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 4, p. 427–438, 2001.

IPCC - **Intergovernmental Panel on Climate Change**. Disponível em: <http://www.ipcc-data.org/observ/ddc_co2.html>. Acesso em 12 de dez. 2017.

KANT, S. et al. Partial substitution of NO_3^- by NH_4^+ fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 303–311, 2007.

KANT, S. et al. Improving yield potential in crops under elevated CO_2 : Integrating the photosynthetic and Nitrogen utilization efficiencies. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 162, 2012.

KITAOKA, S. et al. The photosynthetic response of four seral deciduous broad-leaved tree seedlings grown under elevated CO_2 concentrations. **Journal of Agricultural Meteorology**, v. 72, n. 1, p. 43–49, 2016.

KLEIN, D. et al. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and Nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 8, p. 863–871, 2000.

KNAFF, D. B. Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes. In: **Oxygenic photosynthesis: The light reactions**. Lubbock, Texas: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 333–361.

KRAISER, T. et al. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1455–1466, 2011.

KRAPP, A. et al. *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward Nitrogen starvation. **Plant Physiology**, v. 157, n. 3, p. 1255–1282, 2011.

KRAPP, A. Plant Nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 115–122, 2015.

KRONZUCKER, H. J. et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 8, p. 335–337, 2001.

KUEHNY, J. S. et al. Nutrient dilution by starch in CO_2 -enriched chrysanthemum. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 6, p. 711–716, 1991.

LAM, H. M. et al. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **The Plant cell**, v. 7, n. 7, p. 887–98, 1995.

LAWLOR, D. W. Carbon and Nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 773–787, 2002.

LONG, S. P. et al. Rising atmospheric Carbon dioxide: Plants FACE the future. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 591–628, 2004.

LYNCH, J. P.; ST. CLAIR, S. B. Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. **Field Crops Research**, v. 90, n. 1, p. 101–115, 2004.

MAATHUIS, F. J. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 250–258, 2009.

MAEDA, S. et al. Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 7, p. 1311–1324, 2014.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1141–57, 2010.

MAUNA LOA OBSERVATORY (MLO). Disponível em: <<https://www.co2.earth/monthly-co2>>. Acesso em 19 de jan. 2017.

MISRA, J. B. Integrated operation of the photorespiratory cycle and cytosolic metabolism in the modulation of primary Nitrogen assimilation and export of organic N-transport compounds from leaves: A hypothesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 3–4, p. 319–328, 2014.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C3 photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 329, p. 1895–1908, 1998.

NORBY, R. J. et al. Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 6, p. 683–714, 1999.

NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 973–96, 2010.

PETERHANSEL, C. et al. Engineering photorespiration: current state and future possibilities. **Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 754–758, 2013.

PICAULT, N. et al. Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24204–11, 2002.

POORTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, n. 12, p. 1191, 2000.

PRITCHARD, S. G.; ROGERS, H. H. Spatial and temporal deployment of crop roots in CO₂-enriched environments. **New Phytologist**, v. 147, n. 1, p. 55–71, 2000.

RACHMILEVITCH, S.; COUSINS, A. B.; BLOOM, A. J. Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 31, p. 11506–11510, 2004.

RATHNAM, C. K. M. Malate and dihydroxyacetone phosphate-dependent nitrate reduction in spinach leaf protoplasts. **Plant Physiology**, v. 62, n. 2, p. 220–223, 1978.

RAUN, W. R.; JOHNSON, G. V. Improving Nitrogen use efficiency for cereal production. **Agronomy Journal**, v. 91, n. 3, p. 357, 1999.

RAVEN, J. A. Tansley review N^o 2. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, Nitrogen and water. **New Phytologist**, v. 101, n. 1, p. 25–77, 1985.

REUMANN, S.; WEBER, A. P. M. Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C₂ cycle have become filled--others remain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 12, p. 1496–510, 2006.

RIEBESEEL, E. et al. The 2-oxoglutarate/malate translocator mediates amino acid and storage protein biosynthesis in pea embryos. **The Plant Journal**, v. 61, n. 2, p. 350–363, 2009.

RUIZ-VERA, U. M. et al. The role of sink strength and Nitrogen availability in the down-regulation of photosynthetic capacity in field-grown *Nicotiana tabacum* L. at elevated CO₂ concentration. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

- SAGE, Rowan F.; SHARKEY, Thomas D.; SEEMANN, Jeffrey R. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in five C₃ species. **Plant Physiology**, v. 89, n. 2, p. 590-596, 1989.
- SCHEIBLE, W.-R. et al. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to Nitrogen. **Plant Physiology**, v. 136, n. 1, p. 2483–2499, 2004.
- SCHENK, M. K. Nutrient efficiency of vegetable crops. **Acta Horticulturae**, n. 700, p. 21–34, 2006.
- SCHWACKE, R. ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. **Plant Physiology**, v. 131, n. 1, p. 16–26, 2003.
- SIERRO, N. et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- SMART, D. R.; BLOOM, A. J. Investigations of ion absorption during NH₄⁺ exposure I. Relationship between H⁺ efflux and NO₃⁻ absorption. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 318, p. 95–100, 1998.
- STITT, M. et al. Steps towards an integrated view of Nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 959–70, 2002.
- TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intra-chloroplast and extra-chloroplast metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 252–260, 2012.
- TAUB, D. R.; WANG, X. Why are Nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO₂? A critical examination of the hypotheses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 11, p. 1365–1374, 2008.
- TAYLOR, A. R.; BLOOM, A. J. Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. **Plant, Cell and Environment**, v. 21, n. 12, p. 1255–1263, 1998.
- TERCE-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**, v. 54, n. 10, p. 1635–1647, 2013.

THORUP-KRISTENSEN, K.; SØRENSEN, J. N. Soil Nitrogen depletion by vegetable crops with variable root growth. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science**, v. 49, n. 2, p. 92–97, 1999.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671–677, 2002.

TIMM, S. et al. A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, v. 20, n. 10, p. 2848–2859, 2008.

VINCENTZ, M. et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by Nitrogen and Carbon metabolites. **The Plant Journal**, v. 3, n. 2, p. 315–324, 1993.

VOSS, I. et al. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 713–722, 2013.

WANG, Y.-Y.; HSU, P.-K.; TSAY, Y.-F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 458–467, 2012.

WEST, P. C. et al. Leverage points for improving global food security and the environment. **Science**, v. 345, n. 6194, 2014.

WILLIAMS, L.; MILLER, A. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 659–688, 2001.

WONG, S.-C. Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth. **Photosynthesis Research**, v. 23, n. 2, p. 171–180, 1990.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant Nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 153–182, 2012.

ZHU, X.-G.; LONG, S. P.; ORT, D. R. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 153–159, 2008.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1 - A fertirrigação com nitrato ou amônio como fontes exclusivas de Nitrogênio, afeta diferencialmente o crescimento e o metabolismo de plantas de tabaco submetidas a alta concentração de dióxido de carbono.

Normas de formatação da ABNT (versão preliminar)

Débora Domiciano¹, Fernanda Carlota Nery², Antonio Chalfun Júnior¹, Renato Paiva¹,
Pollyanna Aparecida Carvalho¹, Débora Oliveira Prudente¹, Lucas Batista de Souza¹, Paulo
Eduardo Ribeiro Marchiori¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João del Rei,
São João del Rei, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

O efeito do aumento da concentração de dióxido de Carbono [CO_2] sobre aspectos fisiológicos da interação entre os metabolismos do Carbono e Nitrogênio foram investigados em plantas de tabaco fertirrigadas com solução nutritiva (SN) completa (Controle) de Hoagland; Arnon (1950) e modificada para conter apenas NO_3^- (Nitrato) ou NH_4^+ (Amônio) como fonte de N. Nas plantas fertirrigadas com NH_4^+ e no controle houve incremento de biomassa em resposta ao aumento da [CO_2], ao passo que este parâmetro foi marcadamente atenuado nas plantas fertirrigadas com NO_3^- . Além disso, mudanças anatômicas na folha das plantas tratadas com NH_4^+ influenciaram positivamente as trocas gasosas, a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do N e conseqüentemente o incremento no teor de proteínas. Em contrapartida, nas plantas que receberam a fonte nítrica e no controle, houve redução substancial da atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas, diminuição da eficiência fotoquímica e da condutância estomática. O melhor desempenho das plantas tratadas com a fonte amoniacal está relacionado a mecanismos fisiológicos que mesmo sob alta [CO_2], permitem a assimilação de NH_4^+ e a redistribuição de N entre diferentes órgãos da planta. Assim, os efeitos da forma de N que as plantas estão absorvendo do solo podem ser tão importantes para o desempenho de crescimento quanto os efeitos da alta [CO_2].

Palavras-chave: Assimilação de Nitrogênio. *Nicotiana tabacum*. Fotossíntese. Aclimação fotossintética. Trocas gasosas.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são altamente dependentes da interação entre os metabolismos do Carbono (C) e do Nitrogênio (N). À medida que uma quantidade significativa de N é necessária como componente da maquinaria fotossintética, a assimilação de dióxido de carbono (CO_2) através da fotossíntese e a produção de biomassa requerem um suprimento de N adequado. Por outro lado, durante a assimilação de N inorgânico, são necessárias quantidades significativas de fotoassimilados para fornecer os esqueletos C que atuam como aceitadores durante a assimilação e utilização do N, além de quantidades significativas de ATP e NAD(P)H que são necessários para direcionar esses processos (NUNES-NESI; FERNIE; STITT, 2010).

Na raiz, a principal fonte de energia para impulsionar a assimilação de N vem da degradação de açúcares pela glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e da rota oxidativa das pentoses fosfato (RPF). Esses açúcares (principalmente sacarose) são sintetizados em tecido

fotossinteticamente ativo e subsequentemente transportados para as raízes, para serem usados como fonte de energia (HELDT; PIECHULLA, 2011). O nitrato (NO_3^-) geralmente é enviado para as folhas onde as reações fotoquímicas podem fornecer poder redutor, na forma de ferredoxina reduzida (Fdred) e ATP para a assimilação (CRAWFORD; FORDE, 2002). Já o amônio (NH_4^+) presente nos tecidos vegetais pode derivar da absorção direta, da redução do NO_3^- , da desaminação de compostos nitrogenados e da fotorrespiração (KANT et al., 2007) ou ainda, da fixação biológica. O NH_4^+ absorvido é predominantemente assimilado nas raízes (FORDE, 2002), embora dependendo da situação, maiores quantidades de NH_4^+ podem ser transportadas para parte aérea. Uma vez que NH_4^+ já está em seu estado totalmente reduzido, ele pode ser diretamente assimilado em diferentes aminoácidos em reações que dependem da entrada de esqueletos de C e energia na forma de poder redutor e ATP (HACHIYA; SAKAKIBARA, 2016).

Neste contexto, a partição do C assimilado pode ser influenciada tanto pela disponibilidade, como pela forma de inorgânica de N absorvida (CHAMPIGNY; FOYER, 1992). Estudos indicam que o fornecimento de NO_3^- ou NH_4^+ como fontes exclusivas de N induzem respostas metabólicas distintas nas plantas (CARLISLE et al., 2012; PATTERSON et al., 2010; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, 2011) e essas mudanças podem ser mais pronunciadas quando as plantas são submetidas a alta $[\text{CO}_2]$ (BLOOM, 2015; BLOOM et al., 2014).

A concentração de N geralmente diminui em altas $[\text{CO}_2]$ (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013; FENG et al., 2015; KANT et al., 2012), indicando que a absorção e a assimilação não acompanham o aumento na síntese de carboidratos e biomassa (WONG, 1990). Esse efeito pode ser ainda mais acentuado se NO_3^- é fornecido como única fonte de N (BLOOM et al., 2010). A redução da condutância (g_s) (SREEHARSHA; SEKHAR; REDDY, 2015) e densidade estomática (CASTRO et al., 2009; TENG et al., 2009), também têm sido observadas como resposta a aclimação a alta $[\text{CO}_2]$ podendo levar a alterações principalmente no transporte de NO_3^- por fluxo de massa (TAUB; WANG, 2008), reduzindo progressivamente o teor de N nas folhas de plantas que assimilam NO_3^- preferencialmente nas folhas. No entanto, as alterações morfológicas vêm sendo negligenciadas, como consequência poucos trabalhos relatam a organização estrutural de tecidos foliares emitidos em condição de alta $[\text{CO}_2]$, embora possam estar relacionados ao processo de aclimação (CAMARGO; MARENCO, 2011).

Apesar de alguns estudos relacionarem a interação entre a alta $[\text{CO}_2]$ e o fornecimento de Nitrogênio (N), pouco se sabe sobre como os mecanismos bioquímicos subjacentes a absorção e assimilação de NO_3^- ou NH_4^+ são influenciados pelo metabolismo do C em plantas C3 para atender os requisitos energéticos da assimilação de N, frente ao aumento das taxas

fotossintéticas, quando essas plantas são submetidas a alta [CO₂]. Essas interações podem ser melhor compreendidas, quando se analisa situações em que as plantas são expostas a diferentes regimes de N, permitindo a introspecção de como perturbações podem ser aliviadas ou mesmo superadas.

Diante do exposto, a seguinte hipótese foi investigada: O metabolismo do N e sua interação com o metabolismo do C são diferentemente afetados em plantas C3 fertilizadas com NO₃⁻ e/ou NH₄⁺ como fontes exclusivas de N e expostas a diferentes [CO₂]. Para isso, com a realização deste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da alta [CO₂] nas respostas fisiológicas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e adicionalmente, compreender como esses parâmetros podem ser diferencialmente modulados pelas fontes inorgânicas de N.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo das plantas e condições experimentais

Aproximadamente 500 sementes de tabaco (*N. tabacum*) cultivar Virgínia Gold foram selecionadas e submetidas à desinfestação durante 30 segundos em 200 mL de etanol a 70% (v/v) após imersão durante 10 min em 200 mL de hipoclorito de Sódio (NaClO) 2,5% (v/v). As sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (p/v), sacarose 3% (p/v) e ágar 0,7% (p/v) para germinação *in vitro*. O pH foi ajustado para 5,7 com NaOH e HCl 2 N antes da autoclavagem a 121 ° C, 1,1 atm durante 20 min. As sementes foram dispostas em frascos contendo 40 mL do meio de cultura. Durante esta fase, as culturas foram mantidas em condições de sala de crescimento a 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20 W, Osram, Brasil).

Ao atingirem aproximadamente 10 cm de comprimento as plantas foram selecionadas quanto à uniformidade e transplantadas para vasos de 500 mL, contendo substrato vermiculita média (90 a 100% das partículas entre 1,19-0,50 mm), sendo então transferidas para a câmara de crescimento controlado (CONVIRON®, ATC60, Canada), com fotoperíodo de 12h, irradiância de 300 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 °C mantidos até o final do experimento. Inicialmente, a câmara de crescimento foi ajustada para proporcionar a concentração de CO₂ de 380 μmol.mol⁻¹. Nessas condições, as plantas foram aclimatizadas por 17 dias, quando se iniciou a imposição dos tratamentos através da fertirrigação com solução nutritiva (SN) completa (Controle) de Hoagland & Arnon (1950) e modificada para conter apenas NO₃⁻ (Nitrato) ou NH₄⁺ (Amônio) como fonte de N (Tabela 1).

A primeira fertirrigação foi preparada para conter ½ força iônica da disponibilidade dos nutrientes essenciais da SN completa e o mesmo procedimento foi adotado no preparo das soluções modificadas, progredindo para força iônica total das soluções nutritivas após 7 dias.

Tabela 1. Composição das soluções nutritivas (SNs) que constituíram os tratamentos. Solução nutritiva completa (SN completa), modificada para conter nitrato (SN 100% NO₃⁻) ou amônio (SN 100% NH₄⁺) como fontes exclusivas de N.

FONTES DE MACRONUTRIENTES					
SN COMPLETA		SN 100% NO ₃ ⁻		SN 100% NH ₄ ⁺	
Fonte	Conc. (mmol.L ⁻¹)	Fonte	Conc. (mmol.L ⁻¹)	Fonte	Conc. (mmol.L ⁻¹)
KNO ₃	<u>6</u>	KNO ₃	<u>6</u>	NH ₄ Cl	<u>16</u>
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	<u>4</u>	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	<u>4</u>	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1
NH ₄ H ₂ PO ₄	<u>2</u>	NaNO ₃	<u>2</u>	CaCl ₂ .2H ₂ O	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	MgSO ₄ .7H ₂ O	1	K ₂ SO ₄	1
-	-	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2	KCl	1
FONTES DE MICRONUTRIENTES EM TODAS SNs					
Fonte		Conc. (µmol.L ⁻¹)			
FeSO ₄ .7H ₂ O		40			
Na ₂ EDTA		40			
H ₃ BO ₃		25			
MnSO ₄ .H ₂ O		2			
ZnSO ₄		2			
CuSO ₄ .5H ₂ O		0,5			
Na ₂ MoO ₄		0,5			

A fertirrigação foi realizada semanalmente com 100 mL de solução nutritiva (pH 5,5 ± 0,5) referente a cada um dos tratamentos, de modo a evitar o extravasamento da solução.

A irrigação no intervalo entre a aplicação da SN era igualmente feita com 100 mL de água destilada diariamente, exceto dois dias antes da fertirrigação semanal, quando os vasos eram submetidos à lavagem do substrato através da irrigação com aproximadamente 500 mL de água destilada para forçar o extravasamento e evitar que a sobreposição da fertirrigação pudesse provocar acúmulo de íons no substrato. Ao todo foram realizadas cinco fertirrigações.

Após 45 dias da transferência para a câmara de crescimento e 28 dias após o início da fertirrigação com as soluções que constituíram os tratamentos com fonte de N, a concentração de CO₂ foi ajustada para 760±44,8 µmol.mol⁻¹. Condição em que as plantas permaneceram por mais 5 dias. A temperatura no interior da câmara de crescimento durante o período experimental se manteve constante (25 °C dia/23 °C noite), e a variação para umidade foi de 71,44 ± 7,7% como especificado na Figura 1.

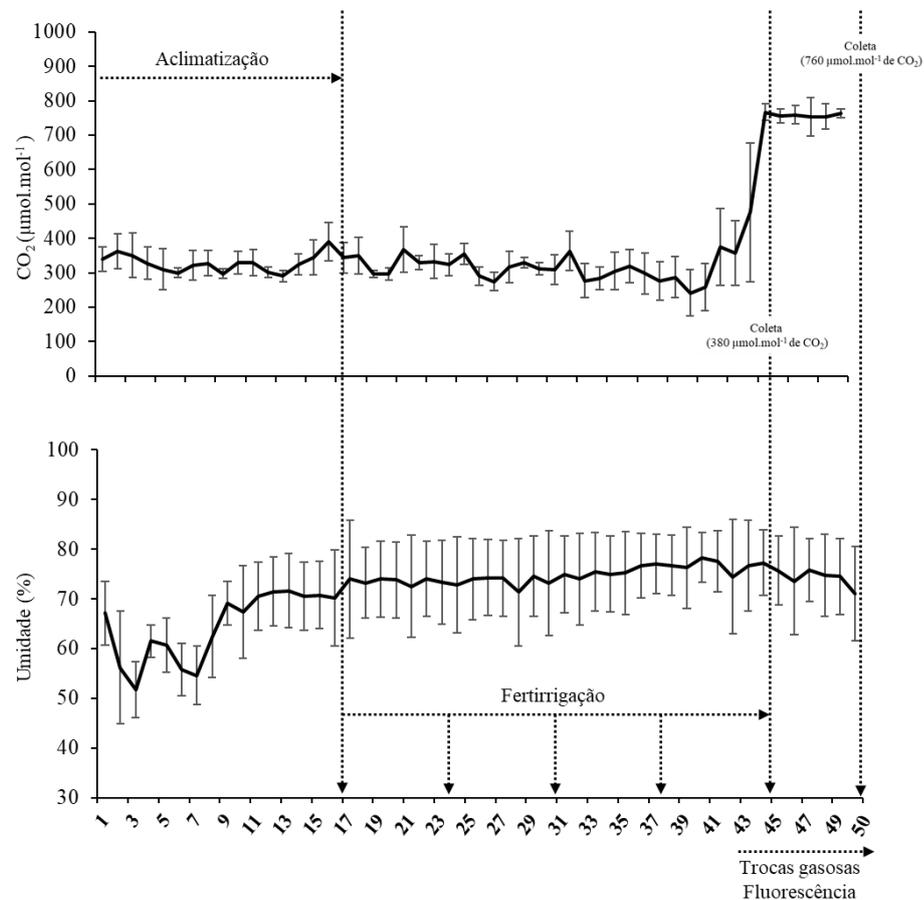


Figura 1. Concentração de CO_2 ($\mu\text{mol.mol}^{-1}$) e umidade relativa (%) no interior da câmara de crescimento durante todo o período experimental (50 dias). Cada ponto indica a média ($n=24$ horas) \pm desvio padrão.

2.2 Determinação da matéria seca e da taxa de crescimento relativo

Para determinação da matéria seca (MS) acumulada as plantas foram coletadas aos 45 ($380 \mu\text{mol.mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol.mol}^{-1}$) após a transferência para a câmara de crescimento. As plantas foram pesadas e posteriormente secas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C durante 72 horas e em seguida novamente pesadas para cálculo da matéria seca (MS). A taxa de crescimento relativo (TCR), foi calculada baseando-se no aumento da MS aos 45 e 50 dias em função da MS inicial obtida das plântulas após a transferência para a câmara de crescimento. A TCR foi calculada de acordo com Cairo et al. (2008) e é dada pela fórmula:

$$\text{TCR} = \frac{\text{Ln (MS1)} - \text{Ln (MS2)}}{\text{T1} - \text{T2}}$$

em que: Ln = logaritmo neperiano da matéria seca (MS) nos tempos T1 e T2.
T1 e T2 - tempo inicial e final, respectivamente.

2.3 Avaliações anatômicas

As folhas foram coletadas aos 45 dias ($380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) após a transferência das plantas para a câmara de crescimento. As folhas coletadas aos 50 dias foram as recentemente expandidas, após o aumento da concentração de CO_2 . As amostras foram fixadas em formol, ácido acético e álcool (F.A.A.) 70% (JOHANSEN, 1940), por 24 horas e posteriormente conservadas em etanol 70% (v/v). Todos os cortes foram efetuados à mão livre, com o auxílio de lâminas de barbear estéril (Gillete[®], Brasil), usando isopor e medula do pecíolo de embaúba como material de suporte. As características anatômicas da secção transversal do limbo foliar foram obtidas de um total de cinco folhas do terço superior das plantas de tabaco, utilizando-se três campos por cada folha, totalizando 15 repetições por cada tratamento. Para as secções paradérmicas foram observados quatro campos em cada região da lâmina foliar, totalizando 10 folhas por tratamento. Todos os cortes foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio (3% de cloro ativo), tríplice lavagem em água destilada e coloração com solução safrablau (azul de astra 0,1% e safranina 1%, na proporção de 7:3). Posteriormente, os cortes foram montados em lâminas semipermanentes com glicerol 50% (v/v) (KRAUS; ARDUIN, 1997). As características anatômicas avaliadas foram: espessura do mesofilo na face abaxial e espessura do parênquima paliçádico; densidade estomática (DE - número de estômatos por unidade de área) e a funcionalidade estomática (FUN - considerada como a relação diâmetro polar/diâmetro equatorial dos estômatos) (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

2.4 Quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a*, *b* e carotenoides

Para determinação dos teores de pigmentos as folhas foram coletadas aos 45 dias ($380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) após a transferência das plantas para a câmara de crescimento. Foram macerados 0,1 mg de tecido foliar em acetona 80%. Após filtração, o volume final foi completado para 10 mL e, em seguida foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 645 e 663 nm para as clorofilas *a* e *b* respectivamente, para os teores de carotenoides, foram realizadas leituras a 445 nm, segundo a metodologia descrita por Lichtenthaler; Buschmann (2001)

2.5 Medições das trocas gasosas

As avaliações das trocas gasosas foram feitas diariamente no período entre 43 e 50 dias após a transferências das plantas para câmara de crescimento, somando 7 dias de avaliação dos quais 3 dias em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ e 4 dias em $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. As medições foram realizadas no terço médio da planta em folha completamente expandida entre 9 e 11 horas da manhã. Foram considerados a taxa líquida de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E), relação entre a concentração de carbono na câmara subestomática e carbono externo (C_i/C_a) e a eficiência instantânea do uso da água ($\text{EUA} = A/E$). Nas mesmas folhas, foram realizadas medidas de respiração no escuro (R_d), no período entre 4:00 e 5:00 horas da manhã. As medições foram obtidas com auxílio de um analisador portátil de trocas gasosas, IRGA modelo LI6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, EUA.

Em posse dos dados referentes a trocas gasosas, calculou-se a taxa fotorrespiratória (FR) de acordo com Sharkey (1988), segundo as equações:

$$FR = \frac{v_0}{2}$$

$$v_0 = (A + R_d)/(1\phi - 0,5)$$

onde v_0 é a taxa de oxigenação da Rubisco, A é taxa assimilatória líquida de CO_2 , R_d é a respiração medida no escuro, e ϕ é a relação entre as taxas de carboxilação e oxigenação da Rubisco apud Farquhar e Von Caemmerer (1982).

2.6 Curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO_2 no sítio de carboxilação

As curvas de resposta da taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) ao aumento da concentração intercelular de CO_2 (C_i) foram realizadas no terço médio da planta em folha completamente expandida aos 45 dias ($380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). Para a curva A/C_c , a irradiância foi mantida constante a $1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A concentração de CO_2 foi modificada gradualmente na câmara de medida e variaram de 50 a $1700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, na seguinte ordem: 380, 200, 100, 50, 380, 600, 800, 1300 e $1700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Para a elaboração da curva, foi utilizado o modelo bioquímico desenvolvido por Sharkey (2016) para plantas C3, utilizando-se valores de C_c , ao invés de C_i , por meio do programa desenvolvido pelo mesmo autor em Excel. Segundo esse modelo, a taxa fotossintética líquida é dada pelo menor valor que

se pode obter, em razão das limitações impostas pela atividade da Rubisco (A_c), pela taxa de transporte de elétrons (A_j) ou pela utilização das trioses fosfato (A_p), ou seja:

$$A = \min\{A_c, A_j, A_p\}$$

onde:

$$A_c = \frac{(C_c - \Gamma^*)V_{cmax}}{C_c + k_c + \frac{O}{k_o}} - R_c$$

$$A_j = J \frac{C_i - \Gamma^*}{4C_i - 8\Gamma^*}$$

$$A_p = 3TPU$$

onde C_c é a pressão parcial de CO_2 no cloroplasto, Γ^* é o ponto de compensação fotorrespiratório, V_{cmax} a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco, K_c a constante cinética da reação de carboxilação da Rubisco, K_o a constante cinética da reação de oxigenação da Rubisco; O a pressão parcial de O_2 no cloroplasto, R_c a taxa de respiração mitocondrial na luz, J a taxa de transporte elétrons utilizados para regeneração da ribulose 1,5 bifosfato (RuBP) e TPU a taxa de utilização da triose-fosfato.

2.7 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi obtida utilizando-se um fluorômetro portátil (FluorPEN FP 100, Photon System Instrument, CzechRepublic). As medições foram feitas aos 45 ($380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) e 50 dias ($760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) após a transferência das plantas para câmara de crescimento. As medições foram realizadas no terço médio da planta em folha completamente expandida. As folhas selecionadas foram adaptadas ao escuro durante 30 min, período de tempo suficiente para que todos os centros de reação de PSII se tornem oxidados (STIRBET et al., 2001). Imediatamente após a adaptação ao escuro, as folhas foram expostas a

um pulso de luz saturante com uma intensidade de $2700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com um comprimento de onda de 650 nm por 5 s. Os transientes de fluorescência F_0 , F_v e F_m foram registrados de 10 μs a 5 s a resolução de 12 bits.

2.8 Quantificação de amido, sacarose, açúcares redutores, proteína e aminoácidos

Para quantificação de amido, sacarose, açúcares redutores, proteínas e aminoácidos amostras de folhas completamente expandidas e raízes foram coletadas aos 45 dias ($380 \mu\text{mol.mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol.mol}^{-1}$). O material vegetal foi seco em estufa com circulação forçada de ar a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 horas e posteriormente armazenados em papel tipo craft até o dia das análises. Os carboidratos, proteínas e aminoácidos foram extraídos pela homogeneização de 0,2 g de MS 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 e os sobrenadantes, combinados perfazendo um volume final de 10 mL. O extrato bruto foi utilizado para a quantificação de amido e sacarose pelo método Antrona (DISCHE, 1962), os açúcares redutores foram quantificados de acordo com protocolo descrito por Miller, (1959), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), a proteína total pelo método de Bradford (1976) e aminoácidos totais livres pelo ensaio da ninhidrina (KENDALL, 1963).

2.9 Quantificação de amônio e nitrato endógeno

Amostras de folhas completamente expandidas dispostas no terço médio da planta e raízes foram coletadas aos 45 dias ($380 \mu\text{mol.mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol.mol}^{-1}$) e imediatamente transferidas para conservação em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o dia das análises. Amostras de 0,1 g de massa fresca foram maceradas com nitrogênio líquido e, posteriormente transferidas para tubos, aos quais foram acrescentados 2 mL de água ultra purificada. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto nas quantificações de NH_4^+ e NO_3^- endógeno. O NH_4^+ foi determinado de acordo com a reação conhecida como fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967). A quantificação de NO_3^- foi realizada de acordo com o método descrito por (CATALDO et al., 1975).

2.10 Atividade das isoformas de invertase

Foram avaliadas as atividades das três isoformas de invertase (EC 3.2.1.26): ácida do vacúolo (IAV), neutra do citosol (INC) e ácida da parede (IAP), em amostras de tecidos de raízes, coletadas aos 45 dias ($380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) após a transferência das plantas para a câmara de crescimento. A extração das isoformas de invertase foi feita pela homogeneização de 0,4 g de tecido fresco de raízes adicionados de 1,5 mL de meio constituído de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mM), MgCl_2 (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 extração da invertase ácida da parede celular. Na extração da invertase ácida da parede, a metodologia foi realizada de acordo com Fahrendorf; Beck, (1990). As atividades enzimáticas foram avaliadas pela quantificação de açúcares redutores produzidos, segundo protocolo descrito por Miller (1959), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

2.11 Atividade das enzimas do metabolismo do Nitrogênio

Amostras de folhas completamente expandidas dispostas no terço médio da planta e raízes foram coletadas aos 45 dias ($380 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) e imediatamente transferidas para conservação em freezer a -80 °C até o dia das análises. Para a realização dos ensaios das enzimas reductase do nitrato (RN), glutamina sintase (GS), glutamina oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) e desidrogenase do glutamato (GDH) os extratos enzimáticos foram obtidos a partir da maceração de 1,0 g de tecidos (folhas e raízes) em nitrogênio líquido, adicionados de 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 Berges; 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 TrisHCl, 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 NAD(P)H foi monitorada pelo decréscimo da absorvância em 340 nm durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto e a quantificação foi feita a partir dos 5 minutos de decaimento.

2.12 Atividade das enzimas antioxidantes, quantificação de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica

Amostras de folhas completamente expandidas dispostas no terço médio da planta e raízes foram coletadas aos 45 dias ($380 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) e aos 50 dias ($760 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) e imediatamente transferidas para conservação em freezer a -80 °C até o dia das análises. Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir de 200 mg de tecidos foliares ou radiculares macerados em N_2 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 (EC 1.15.1.1) 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 (E.C. 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir; Mchale (1987). A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da APX (EC 1.11.1.11) foi determinada segundo Nakano; Asada (1981), por meio do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm e o coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

O H_2O_2 foi quantificado a partir de 200 mg de tecidos (folhas e raízes) 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 absorbância 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; YORDANOV; EDREVA, 2000).

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege; Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido radicular e foliar foram macerados em N_2 líquido acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas de 250 μL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA), incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 minutos. A paralisação da reação aconteceu por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em μmol de MDA g^{-1} de matéria fresca.

2.13 Delineamento Experimental

O experimento foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (3 x 2). Sendo os fatores de variação as três fontes de N (controle, somente NO_3^- e somente NH_4^+), duas concentrações de CO_2 (380 e 760 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), considerando cinco

repetições independentes. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software estatístico R ver. 3.4.3. 2018.

3 RESULTADOS

3.1 Determinação da matéria seca e da taxa de crescimento relativo

O acúmulo de matéria seca (MS) em plantas de tabaco (Figura 2A) foi significativamente afetado pela fonte de Nitrogênio (N) em ambas concentrações de $[CO_2]$ (380 e $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). As plantas fertirrigadas com a solução nutritiva (SN) completa (controle) tiveram o maior acúmulo de biomassa (2,94 g), seguido das plantas tratadas com nitrato (NO_3^- - 1,95 g) e o menor valor observado para as plantas que receberam amônio (NH_4^+) como fonte exclusiva de N (0,4 g). Com o aumento da concentração de CO_2 $[CO_2]$ para $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, houve incremento na MS de 54% para o controle e de 77% para as plantas que receberam a fonte amoniacal (NH_4^+), enquanto não foi observada diferenças significativas para a $[CO_2]$ nas plantas que receberam a fonte nítrica (NO_3^-).

Em relação ao acúmulo de biomassa nas raízes, sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, o controle e as tratadas com NO_3^- não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo o menor valor observado para a fonte amoniacal (Figura 2B). No entanto, com o aumento na $[CO_2]$, houve incremento de 20% de MS nas raízes do controle e de 88% nas plantas tratadas com NH_4^+ , enquanto para as plantas que receberam a fonte nítrica foi observada redução de 54% para este parâmetro.

Embora as plantas tratadas com NH_4^+ tenham apresentado o menor valor de MS total sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, a exposição a alta $[CO_2]$ levou a um aumento expressivo no acúmulo de MS em $\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ (Figura 2C; 3), chegando a ser 8,3 vezes maior que o valor observado em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ e 1,8 vezes maior que o controle e 5 vezes maior que o incremento em MS $\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ nas plantas tratadas com NO_3^- .

Em relação ao particionamento de MS entre a parte aérea e a raiz (R/PA), o controle e as plantas tratadas com NO_3^- apresentaram maiores valores de R/PA do que as plantas tratadas com NH_4^+ quando cultivadas em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 2D). Porém, mudanças nos padrões de alocação de MS foram afetados pelo aumento da $[CO_2]$ nas plantas fertirrigadas com NH_4^+ , superando os demais tratamentos. Quando se analisa o efeito da $[CO_2]$ dentro da fonte de N, foi observada uma diminuição de aproximadamente 45% na R/PA para o controle e tratadas com NO_3^- . Já para as plantas fertirrigadas com NH_4^+ , a $[CO_2]$ não interferiu neste parâmetro.

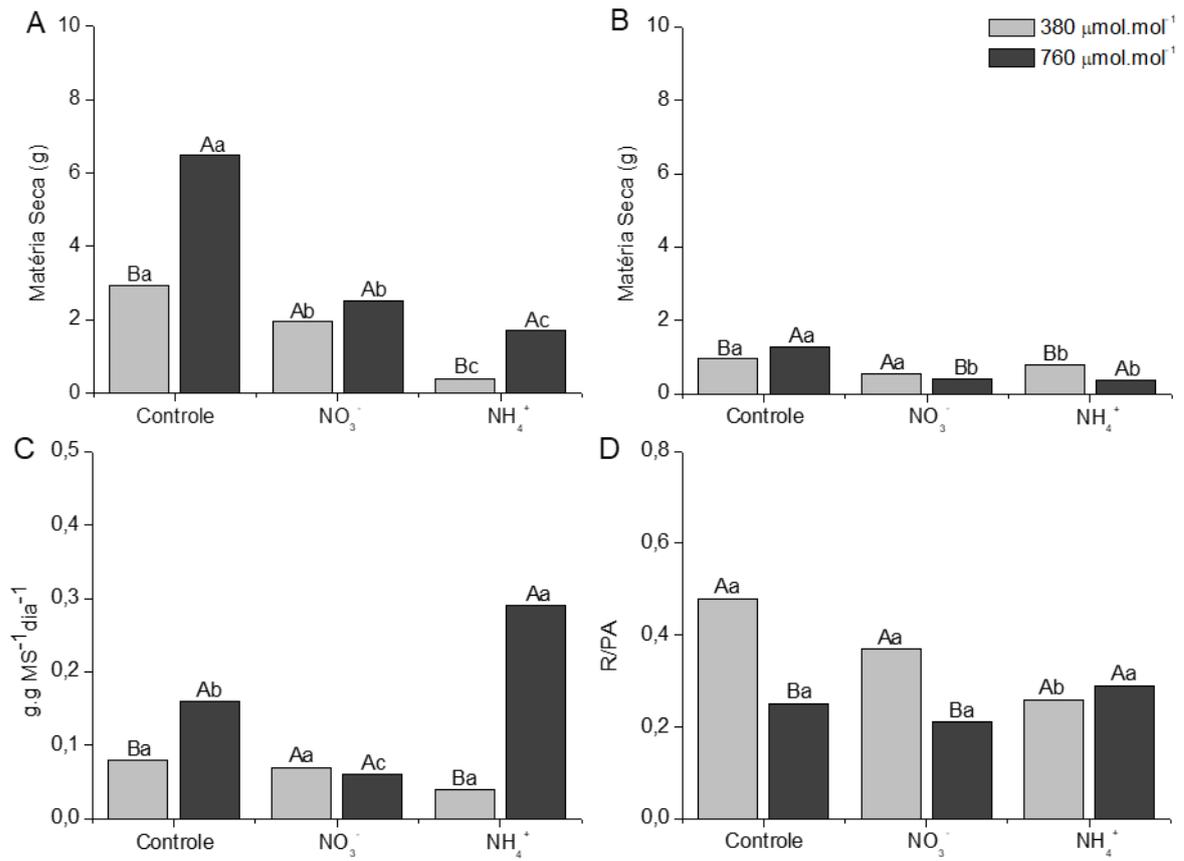


Figura 2. Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de Nitrogênio no acúmulo de matéria seca (MS) total (A), MS da raiz (B), na taxa de crescimento relativo (C) e na razão de MS raiz/parte aérea (D) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO₂ dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

3.2 Avaliações anatômicas

Não houve diferença significativa entre as fontes de Nitrogênio aplicadas sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a variável Funcionalidade Estomática (FUN). No entanto, nas folhas desenvolvidas sob 760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ foram observadas diferenças significativas. A fonte nitrogenada NH_4^+ , apresentou maior FUN, o que resultou na permanente abertura estomática para as plantas que receberam somente esta fonte de N.

Tabela 2. Valores médios referentes a Funcionalidade Estomática (FUN); Densidade Estomática (DE); Espessura do Mesofilo (EM); Parênquima Lacunoso (PL) e Comprimento do Tricomas (CTR) na superfície foliar abaxial de plantas de tabaco submetidas a fertirrigação com diferentes fontes nitrogenadas e expostas a duas concentrações de CO_2 .

	380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$			760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$		
	Tratamentos			Tratamentos		
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	Controle	NO_3^-	NH_4^+
FUN	1,14 Ba	1,08 Ba	1,16 Aa	1,28 Aa	1,34 Aa	1,14 Ab
DE	29,6 Aa	29,2 Ab	24,1 Aa	12,9 Bb	14,5 Ba	18,6 Bb
EM	122,0 Bc	161,1 Bb	184,2 Ba	172,7 Ac	210,7 Ab	299,6 Aa
PL	67,5 Bb	56,4 Bc	88,9 Ba	88,2 Ac	111,9 Ab	168,8 Aa
CTR	188,6 Bc	243,0 Bb	251,5 Ba	241,8 Ab	298,5 Aa	305,9 Aa

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste Scott-Knott.

A densidade estomática (DE) foi maior ($p < 0,05$) nas folhas desenvolvidas sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ independente da fonte de N utilizada (Tabela 2; Figura 3).

No geral, as folhas de tabaco apresentaram de uma a duas camadas de parênquima paliçádico com células pouco alongadas e cerca de quatro a cinco camadas de parênquima lacunoso com espaços intercelulares pouco visíveis (Figura 4). Verificou-se que todas as fontes de N aplicadas induziram aumentos na espessura do mesofilo (EM) e do parênquima lacunoso (PL) sob 760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabela 2; Figura 4). No entanto, a diferença mais expressiva foi obtida nas plantas fertirrigadas com NH_4^+ , resultando em uma maior espessura do EM e do PL (Tabela 2).

As folhas de tabaco apresentam tricomas glandulares multicelulares com pedúnculo bisseriado e cabeça secretora globosa com células unisseriadas (células de Sósten) em ambas as superfícies (Figura 5). Constatou-se uma variação significativa no comprimento total dos

tricomas (CTR) analisados, onde os tratamentos com fonte de N exibiram aumento no tamanho dos tricomas e acúmulo de secreção sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabela 2; Figura 5). As plantas tratadas com NH_4^+ e as que receberam a fonte nítrica superaram o controle em ambas $[\text{CO}_2]$.

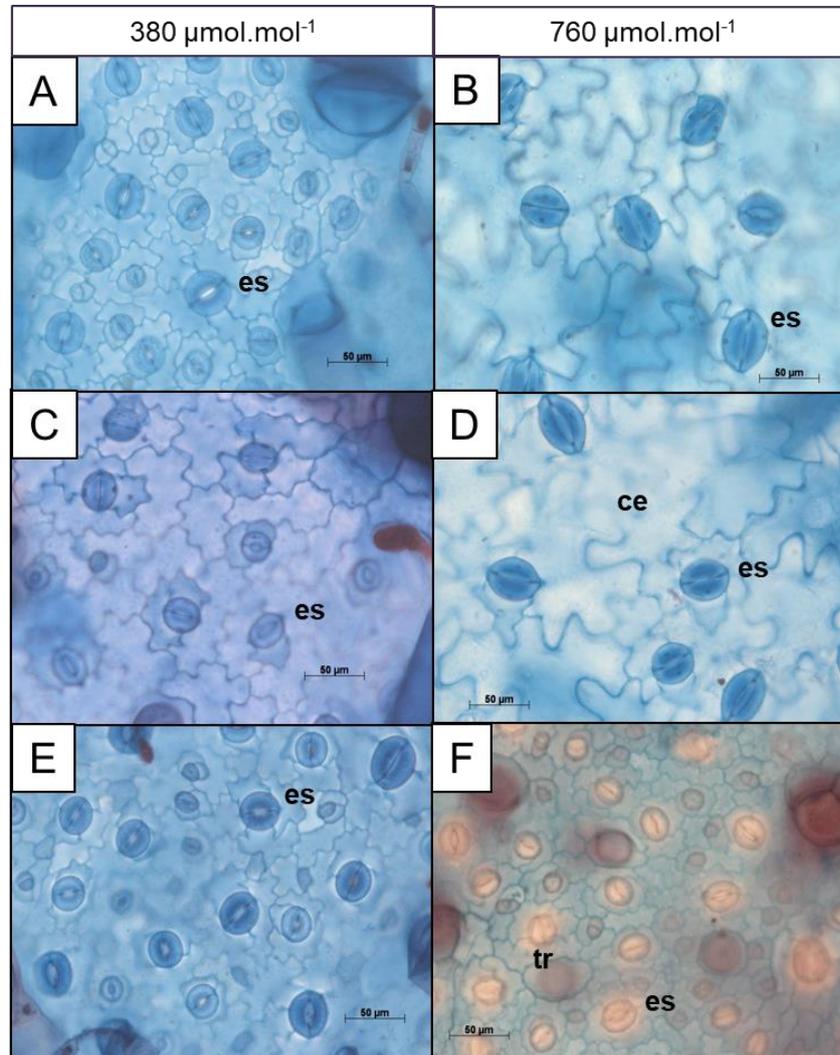


Figura 3. Secções paradérmicas da face abaxial das folhas de tabaco submetidas a fertirrigação com diferentes fontes nitrogenadas: Solução nutritiva (SN) completa (A); SN modificada para conter apenas nitrato (NO_3^-) (C); ou amônio (NH_4^+) (E) como fonte de N, sob concentração de CO_2 de $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ e SN completa (B); SN modificada para conter apenas nitrato (NO_3^-) (D); ou amônio (NH_4^+) (F) como fonte de N sob concentração de CO_2 de $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Observa-se células epidérmicas comuns (ce) com paredes sinuosas, estômatos anomocíticos (es) e tricomas aparentes (tr).

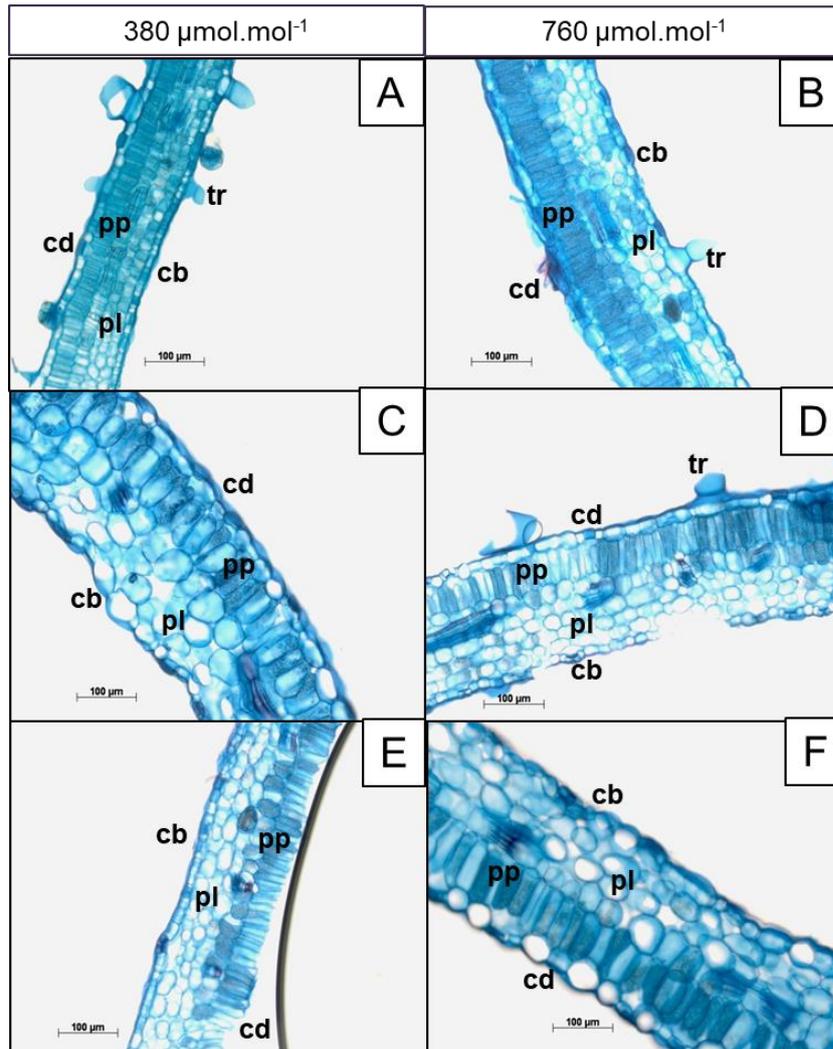


Figura 4. Secções transversais de folhas de tabaco submetidas a fertirrigação com diferentes fontes nitrogenadas: Solução nutritiva (SN) completa (A); SN modificada para conter apenas nitrato (NO_3^-) (C); ou amônio (NH_4^+) (E) como fonte de N, sob concentração de CO_2 de $380 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ e SN completa (B); SN modificada para conter apenas nitrato (NO_3^-) (D); ou amônio (NH_4^+) (F) como fonte de N sob concentração de CO_2 de $760 \mu\text{mol.mol}^{-1}$. Observam-se células epidérmicas da face abaxial (cb); células epidérmicas da face adaxial (cd); parênquima paliçádico (pp); parênquima lacunoso (pl); tricomas (tr).

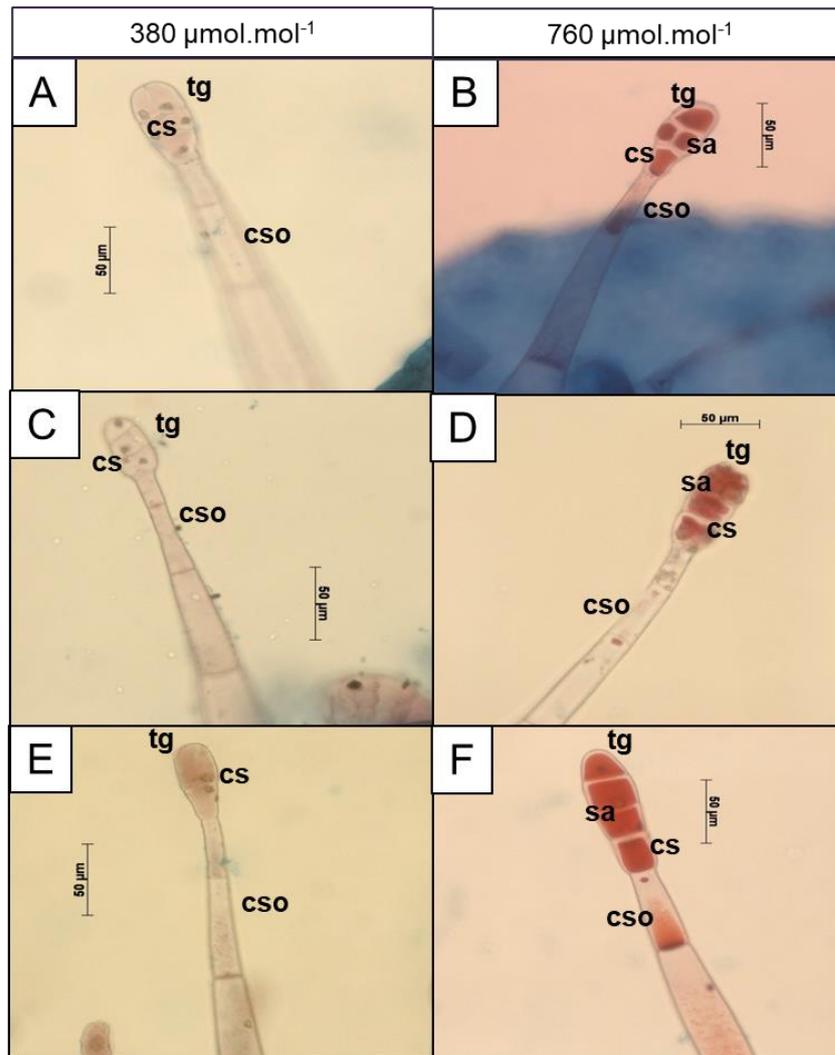


Figura 5. Secções paradérmicas da face abaxial das folhas de tabaco submetidas a fertirrigação com diferentes fontes nitrogenadas: Solução nutritiva (SN) completa (A); SN modificada para conter apenas nitrato (NO_3^-) (C); ou amônio (NH_4^+) (E) como fonte de N, sob $380 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ e SN completa (B); SN modificada para conter apenas nitrato (NO_3^-) (D); ou amônio (NH_4^+) (F) como fonte de N sob $760 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Observa-se tricomas glandulares (tg); célula secretora (cs); secreção acumulada (sa) e células de sósten (cso).

3.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a*, *b* e carotenoides

Os teores de clorofila *a* foram marcadamente influenciados pela fonte de N sob $380 \mu\text{mol.mol}^{-1}$, sendo os maiores valores observados para as plantas fertirrigadas com NO_3^- , seguido do controle e os menores valores obtidos para as plantas que receberam a fonte amoniacal (Figura 6). Sob essa mesma $[\text{CO}_2]$, os teores de clorofila *b* também foram significativamente influenciadas pela fonte nitrogenada aplicada, sendo a maior concentração deste pigmento observada para o controle e a menor nas plantas fertirrigadas com NH_4^+ (Figura 7).

Sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, as plantas fertirrigadas com NH_4^+ exibiram os maiores teores de clorofila *a* em comparação com o controle e NO_3^- que não diferiram significativamente entre si. Para o teor de clorofila *b*, a fonte nitrogenada não interferiu no conteúdo deste pigmento sob esta $[\text{CO}_2]$. No entanto, quando se analisa o aumento na $[\text{CO}_2]$, houve redução nos teores de clorofila *a* de 34% no controle e de 31% nas plantas fertirrigadas com NO_3^- em relação aos valores observados em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto para as plantas que receberam a fonte amoniacal foi constatado aumento de 15%. O mesmo comportamento foi constatado para os teores de clorofila *b* em relação as fontes de N quando as plantas de tabaco foram submetidas a alta $[\text{CO}_2]$, sendo a redução neste parâmetro de 42% para o controle, seguido de 28% para as plantas fertirrigadas com NO_3^- e aumento de 48% nas plantas que receberam a fonte amoniacal. O conteúdo de carotenoides não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 6).

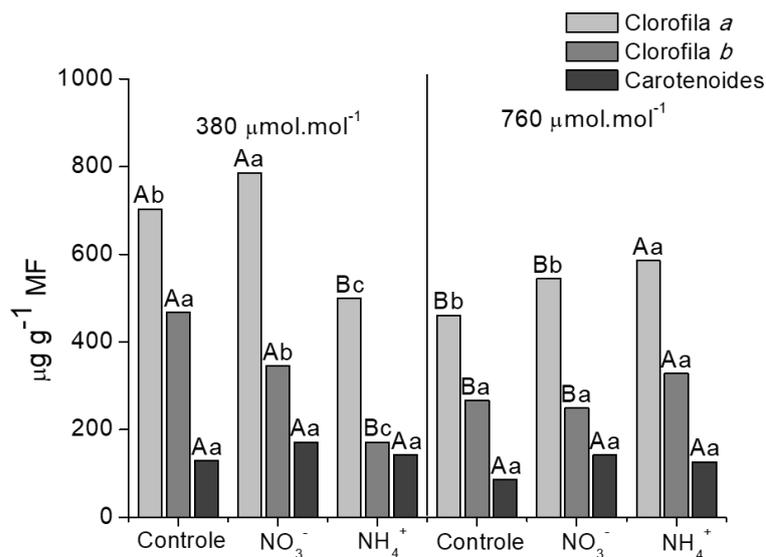


Figura 6. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio no teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides em plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

3.4 Medições das trocas gasosas

Para as medições de trocas gasosas nos três primeiros dias de avaliação na concentração de $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, houve oscilações para taxa de fotossíntese líquida (*A*) (Figura 7A) dentro da fonte de N. O controle teve maior *A*, em média $11,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, destacando-se dos demais tratamentos no primeiro dia de avaliação, enquanto as plantas que receberam NO_3^- ou NH_4^+ como fonte de N, os valores de *A* foram em média de $8,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por outro

lado, no primeiro dia do aumento da concentração de CO_2 para $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, houve incremento de A nas plantas de tabaco para todas as fontes de N, sendo o maior valor observado para as plantas fertirrigadas com NH_4^+ , onde A foi de $21,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, seguido do controle com A de $19,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto os menores valores foram constatados para as plantas que receberam a fonte nítrica com $15,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. No entanto, no controle e nas plantas tratadas com NO_3^- , A diminuiu, sendo a diferença constatada entre o primeiro e o último dia de avaliação sob alta $[\text{CO}_2]$ de 27% para o controle e de 32% para as plantas tratadas com NO_3^- . Em contrapartida, nas plantas tratadas com NH_4^+ , o aumento de A no primeiro dia de medição em $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ se mantém para o restante dos dias avaliados, atingindo a maior A ($22 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) no terceiro dia de exposição (Figura 7A).

Em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ a condutância estomática (g_s) do controle foi em média 65% superior a observada para os tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ , que tiveram valores similares (Figura 7B). No entanto, todos os tratamentos responderam inicialmente ao aumento na concentração de CO_2 , diminuindo a g_s . No controle a queda da g_s no primeiro dia de aumento da $[\text{CO}_2]$ foi de 78% em relação as medições feitas no terceiro dia em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, chegando a praticamente igualar-se aos valores observados nas plantas fertirrigadas com a fonte nítrica e amoniacal onde a queda foi de 60%. A redução da g_s para as plantas controle e tratadas com NO_3^- se mantiveram para todas as medições feitas sob alta $[\text{CO}_2]$. Por outro lado, assim como observado para A , nas plantas tratadas com NH_4^+ como fonte de N, a g_s aumenta a partir do segundo dia de exposição a concentração de $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ equiparando-se aos valores observados no terceiro dia de medição em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, mantendo-se superior aos demais tratamentos até o último dia avaliado (Figura 7B).

Em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, a taxa transpiratória (E) das plantas controle foram 51% maior do que os valores de E observados para as plantas tratadas com NO_3^- ou NH_4^+ no primeiro dia de avaliação (Figura 7C). Nos demais dias avaliados para essa $[\text{CO}_2]$ a E não diferiu entre as fontes de N. No primeiro dia de exposição a $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, foi observada redução de 53% na E para as plantas controle e de 67% para as plantas que receberam a fonte nítrica, em relação as medições realizadas para esses tratamentos no terceiro dia sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ao contrário, as plantas fertirrigadas com NH_4^+ responderam ao aumento na $[\text{CO}_2]$ com aumento gradual de E , que se manteve superior ao controle e as plantas que receberam a fonte nítrica para todas as medições realizadas em $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 7C).

A relação entre taxa de fotossíntese líquida e a taxa transpiratória (A/E), foi superior no tratamento com NO_3^- apenas no primeiro dia de avaliação em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 7D). Nos demais dias avaliados para essa $[\text{CO}_2]$ não houve diferença entre as fontes de N. A exposição a

760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ resultou em aumento da relação A/E em todas as fontes de N, embora o controle e as tratadas com NO_3^- não tenham diferido entre si. A maior A (Figura 7A), e o aumento seguido de manutenção dos valores de g_s (Figura 7B) e E (Figura 7C) observados para as plantas fertirrigadas com NH_4^+ pode ter contribuído para a menor relação A/E para esse tratamento, no primeiro e no terceiro dia de avaliação sob alta $[\text{CO}_2]$, embora ainda assim, tenha sido maior que os valores observados nas medições realizadas em 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 7D).

A relação entre a concentração de carbono na câmara subestomática e carbono externo (C_i/C_a) oscilou entre os tratamentos nitrogenados para ambas as $[\text{CO}_2]$ (Figura 7E). No primeiro e segundo dia de medição das trocas gasosas sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, as plantas controle apresentaram o maior valor para C_i/C_a , superando significativamente os demais. No entanto, com o aumento da $[\text{CO}_2]$, nas plantas tratadas com NH_4^+ foram observadas a maior relação C_i/C_a para o quarto e sexto dia de avaliação sob 760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 7E).

Para a taxa fotorrespiratória (FR), não foram observadas diferenças entre os tratamentos com as fontes nitrogenadas sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 7F). Com a exposição a alta $[\text{CO}_2]$ as plantas tratadas com NH_4^+ apresentaram a maior taxa fotorrespiratória, superando os demais tratamentos em todos os dias avaliados sob 760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. No quarto e no sétimo dia, nas plantas que receberam a fonte nítrica observou-se a menor FR, embora nos demais dias avaliados este tratamento não tenha diferido significativamente do controle (Figura 7F).

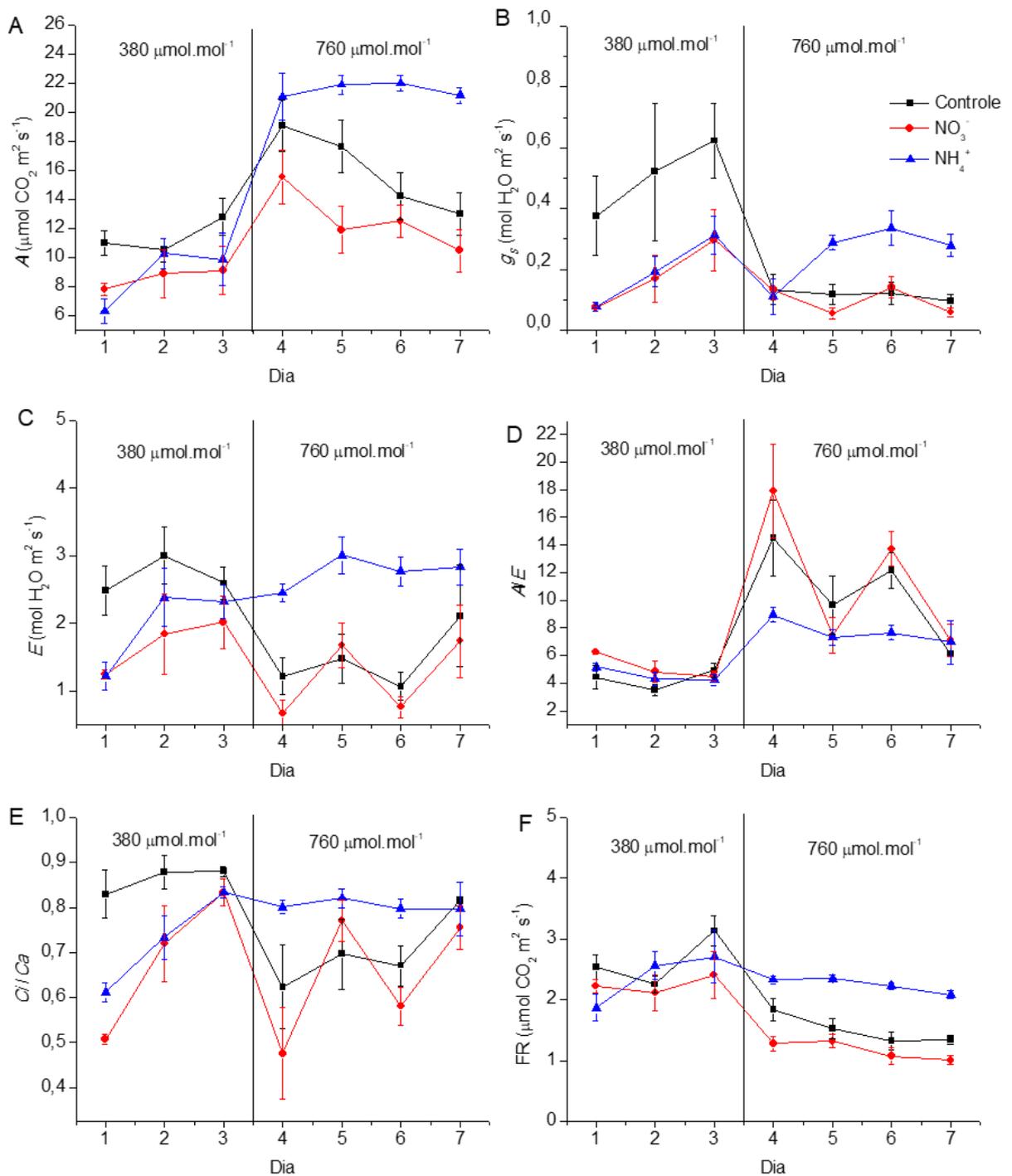


Figura 7. (A) Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio na taxa de fotossíntese líquida (A); (B) na condutância estomática (g_s); (C) na taxa transpiratória (E); (D) na eficiência instantânea de uso da água (A/E); (E) na relação entre a concentração de Carbono na câmara subestomática e Carbono externo (C_i/C_a) e (F) na taxa fotorrespiratória de plantas de tabaco (FR). Cada ponto indica a média ($n=5$) \pm desvio padrão.

3.5 Curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO₂ no sítio de carboxilação

Sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, não houve diferenças significativas entre os tratamentos para a velocidade máxima de carboxilação da ribulose 1,5 bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco, *V_{cmax}*) (Tabela 3). Em contrapartida, a fonte de N influenciou diferencialmente este parâmetro com o aumento na [CO₂]. A maior *V_{cmax}* sob 760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, foi obtida nas plantas tratadas com NH₄⁺, seguida pelo controle e a menor *V_{cmax}* observada para as plantas que receberam a fonte nítrica (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios referentes a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (*V_{cmax}*); taxa de transporte de elétrons usados para regeneração da RuBP (*J*) e, a taxa de utilização de triose-fosfato (*TPU*) de plantas de tabaco submetidas a fertirrigação com diferentes fontes nitrogenadas e expostas a duas concentrações de CO₂.

Tratamentos	380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$			760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$		
	<i>V_{cmax}</i>	<i>J</i>	<i>TPU</i>	<i>V_{cmax}</i>	<i>J</i>	<i>TPU</i>
Controle	56 Ba	124 Ba	9,1 Bb	79 Ab	180 Ab	13,1 Ab
NO ₃ ⁻	60 Aa	108 Bb	9,1 Bb	68 Ac	159 Ac	12,4 Ab
NH ₄ ⁺	60 Ba	128 Ba	18,4 Aa	121 Aa	236 Aa	18,5 Aa

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

A taxa de utilização de triose-fosfato (*TPU*) foi maior nas plantas tratadas com a fonte amoniacal sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto para as plantas que receberam a fonte nítrica e o controle não houve diferenças significativas (Tabela 3). O mesmo foi observado sob alta [CO₂], embora o controle e as plantas tratadas com NO₃⁻ apresentaram aumento da *TPU* quando submetidas a 760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Por outro lado, a [CO₂] não influenciou a *TPU* para as plantas que receberam NH₄⁺ como fonte de N (Tabela 3).

3.6 Fluorescência da clorofila *a*

Sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, as plantas tratadas com NO₃⁻ e as que receberam a fonte amoniacal, não apresentaram diferenças significativas para a relação Fv/Fm superando o controle (Tabela 4). Com a exposição a alta [CO₂], observou-se aumento de Fv/Fm nas plantas que receberam a

fonte amoniacal, seguida do controle e o menor valor observado para as plantas tratadas com NO_3^- . Quando se analisa o efeito da $[\text{CO}_2]$, houve redução significativa deste parâmetro para a fonte nítrica, ao passo que não interferiu nas plantas tratadas com NH_4^+ e controle (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios referentes a eficiência fotoquímica (Fv/Fm) de plantas de tabaco submetidas a fertirrigação com diferentes fontes nitrogenadas e expostas a duas concentrações de CO_2 .

Tratamentos	380 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$	760 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$
	Fv/Fm	Fv/Fm
Controle	0,792 Ab	0,781 Ab
NO_3^-	0,809 Aa	0,694 Bc
NH_4^+	0,808 Aa	0,811 Aa

*As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

3.7 Quantificação de amido, sacarose, açúcares redutores, proteína e aminoácidos

Entre as fontes de N, as folhas das plantas tratadas com NO_3^- e as raízes das plantas que receberam a fonte amoniacal, apresentaram os maiores teores de amido em 380 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ (Figura 8A). No entanto, com o aumento na $[\text{CO}_2]$ esses teores foram reduzidos em 30% nas folhas das plantas que receberam NO_3^- como fonte de N e 47% nas raízes das plantas tratadas com NH_4^+ (Figura 8B). Em contrapartida, a alta $[\text{CO}_2]$ favoreceu o incremento de amido em 45% nas folhas e 32% nas raízes das plantas controle, enquanto para as plantas tratadas com NH_4^+ houve incremento de 26% nas folhas e redução de 51% nas raízes (Figura 8).

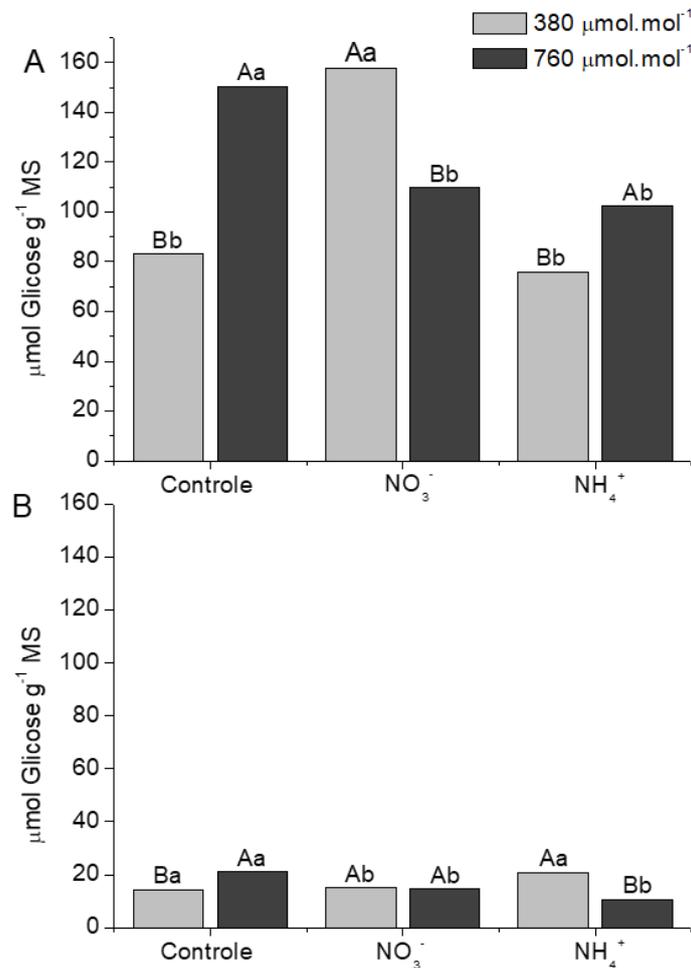


Figura 8. Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de Nitrogênio no teor de amido em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. Letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO₂ dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott Knott.

Quanto ao teor de sacarose as fontes de N diferiram significativamente nas folhas de plantas de tabaco nas avaliações realizadas em 380 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$, sendo os maiores valores observados para o controle com 569,5 $\mu\text{mol Glicose g}^{-1} \text{MS}$, e os menores nas plantas tratadas com NH₄⁺, onde o teor de sacarose foi de 110,2 $\mu\text{mol Glicose g}^{-1} \text{MS}$ (Figura 9A). Ainda para essa [CO₂], os maiores teores de sacarose nas raízes foram observados no controle, enquanto as plantas que receberam NO₃⁻ ou NH₄⁺ como fonte de N não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 9B). No entanto, com o aumento na [CO₂], no controle houve redução de 57% do teor de sacarose nas folhas e de 10% nas raízes, contrastando com as raízes das plantas tratadas com NO₃⁻ e NH₄⁺, onde houve incremento de sacarose de 72% e 43% respectivamente (Figura 9).

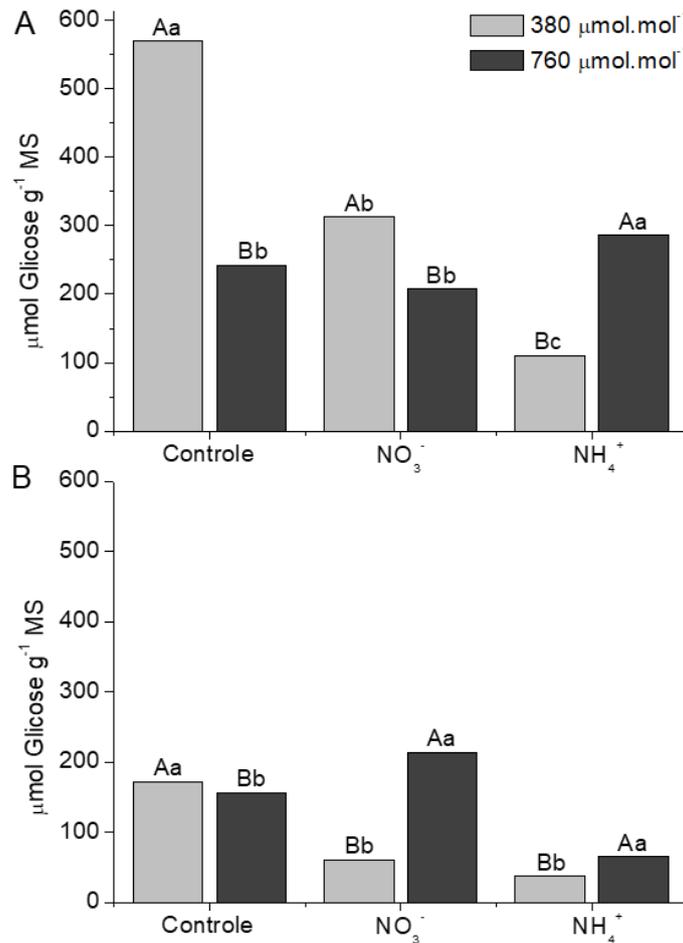


Figura 9. Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de Nitrogênio no conteúdo de sacarose em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO₂ dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott Knott.

As concentrações de açúcares redutores (AR) nas folhas seguiu o mesmo comportamento observado para os teores de sacarose em 380 μmol.mol⁻¹ onde os maiores valores foram observados para as plantas controle com 887,2 μmol AR g⁻¹ MS, seguido das plantas tratadas com NO₃⁻ com 604,4 μmol AR g⁻¹ MS e os menores valores foram obtidos para as plantas que receberam a fonte amoniacal com 287,3 μmol AR g⁻¹ MS (Figura 10A). Por outro lado, o aumento na [CO₂] favoreceu o acúmulo AR nas folhas, em todas as fontes de N, sendo de 35% para o controle, 61% para as plantas tratadas com NH₄⁺ e de 23% para as plantas tratadas com NO₃⁻, embora para essa [CO₂] a fonte nítrica e amoniacal, não tenham diferido significativamente entre si. Nas raízes, em 380 μmol.mol⁻¹ os maiores valores de AR foram constatados nas plantas tratadas com NO₃⁻ com 690,5 μmol AR g⁻¹ MS, enquanto as plantas controle e as que receberam a fonte nítrica apresentaram valores médios de 350,8 μmol AR g⁻¹

MS (Figura 10B). Com o aumento na $[\text{CO}_2]$, a concentração de AR nas raízes aumentou nas plantas fertirrigadas com NH_4^+ em 42%, ao passo que nas plantas tratadas com NO_3^- observou-se redução de 54% de AR, enquanto o controle não apresentou diferenças significativas para o efeito da $[\text{CO}_2]$ (Figura 10B).

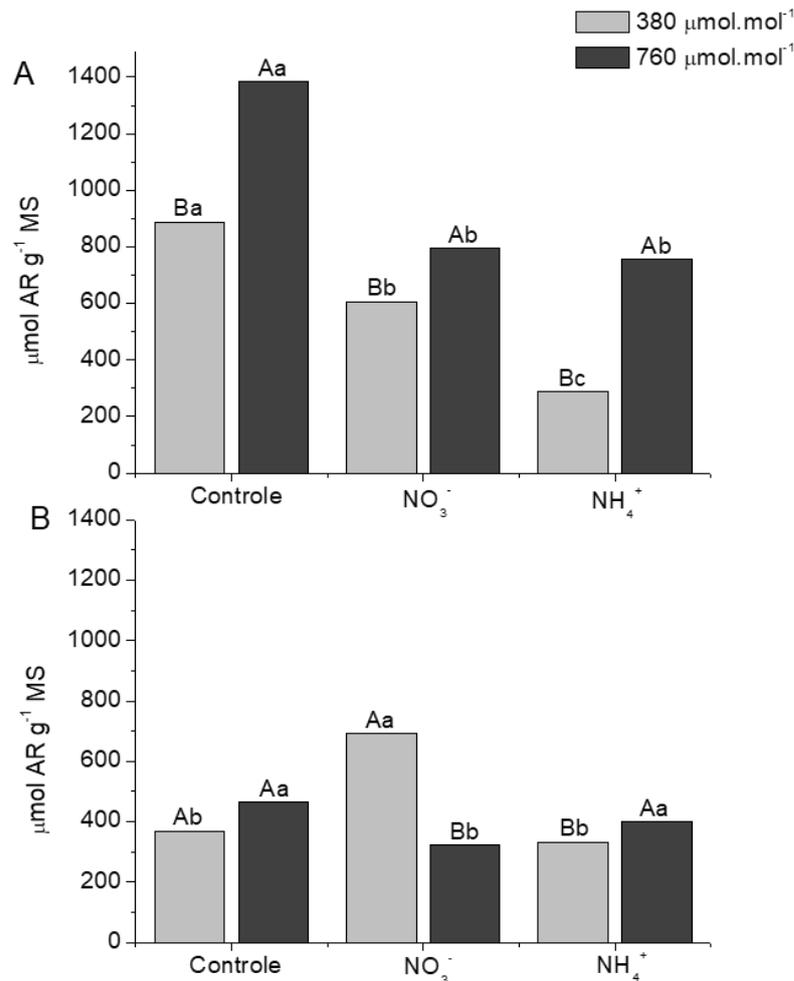


Figura 10. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio no conteúdo de açúcares redutores (AR) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott Knott.

Em $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$, os teores de proteínas (PT) nas folhas foram afetados pela fonte de N em plantas de tabaco. Nas plantas tratadas com NO_3^- os teores de PT foram 14% maiores do que os observados para as plantas controle e 30% maiores do que os observados nas plantas que receberam a fonte amoniacal (Figura 11A). Com o aumento na $[\text{CO}_2]$ o teor de PT foliar também foi diferencialmente influenciado pela fonte nitrogenada. Os maiores valores foram observados para as plantas tratadas com NH_4^+ , onde constatou-se incremento de 19% em relação aos valores

obtidos em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, seguido das plantas controle que apresentaram redução de 19% , sendo os menores valores observados para as plantas que receberam a fonte nítrica com decréscimo de 38% (Figura 11A).

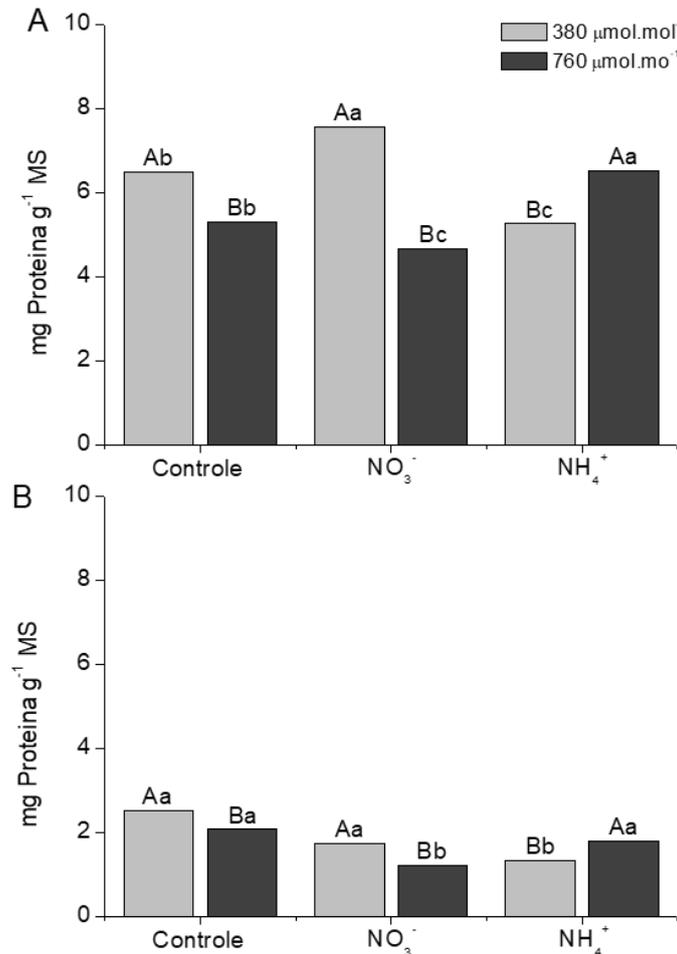


Figura 11. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio no teor de proteínas (PT) nas folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Nas raízes, em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, não houve diferenças significativas para os teores de PT entre as plantas controle e as tratadas com NO_3^- , sendo os menores valores observados para as plantas que recebem NH_4^+ como fonte de N (Figura 11B). No entanto, durante a exposição a alta $[\text{CO}_2]$ as plantas tratadas com NH_4^+ apresentaram aumento de 25% nos teores de PT em relação aos valores obtidos em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, não diferindo estatisticamente das plantas controle, já nas plantas que receberam a fonte nítrica, foram observados os menores teores de PT para essa $[\text{CO}_2]$ e redução de 31% dos teores obtidos em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 11B).

Para os teores de aminoácidos (AA) sob a concentração de $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, observou-se influência da fonte de N nas folhas das plantas de tabaco. Os maiores valores foram obtidos nas plantas tratadas com NH_4^+ com $149,6 \text{ mg AA g}^{-1} \text{ MS}$, seguido das plantas tratadas com NO_3^- com $109,6 \text{ mg AA g}^{-1} \text{ MS}$, e os menores valores constatados para as plantas controle com $81,5 \text{ mg AA g}^{-1} \text{ MS}$ (Figura 12A).

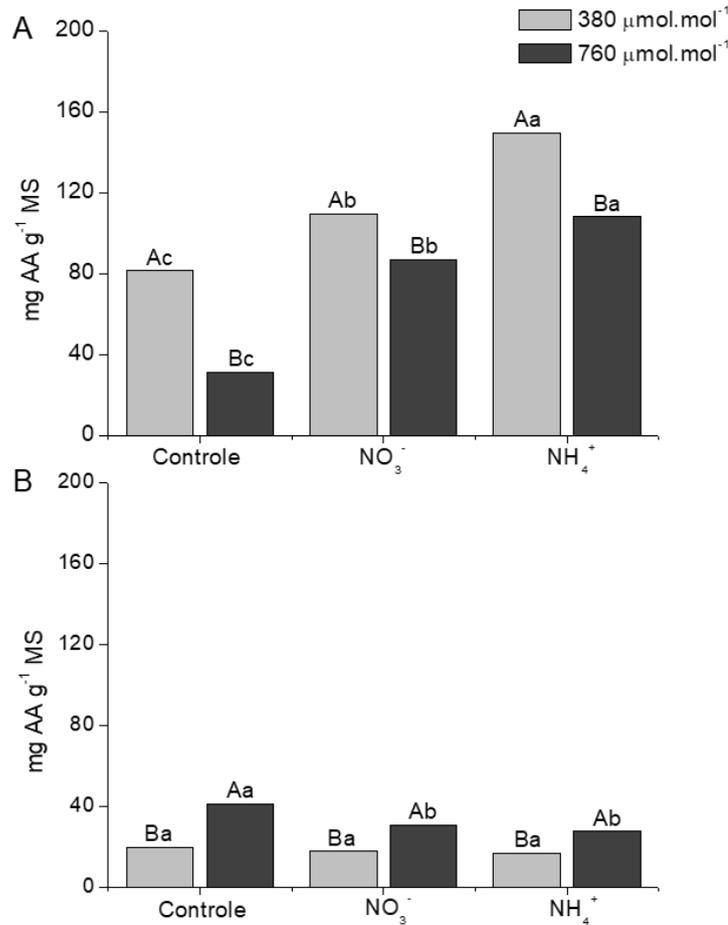


Figura 12. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio no teor de aminoácidos (AA) nas folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

A fonte de N também afetou o teor de AA sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. O aumento na $[\text{CO}_2]$ acarretou em redução desse parâmetro nas plantas controle, sendo os valores 61% menores do que os observados em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 12A). Para a fonte nítrica a redução foi de 21% e 27% para a fonte amoniacal. Nas raízes, não foram observadas diferenças entre as fontes de N em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 12B). Já para a quantificação realizada em $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, os maiores teores de AA nas folhas foram observados para as plantas controle, enquanto a as

plantas tratadas com NO_3^- ou NH_4^+ , não diferiram estatisticamente entre si (Figura 12A). Ao contrário das folhas, nas raízes o aumento na $[\text{CO}_2]$ favoreceu o incremento de AA para todos os tratamentos nitrogenados, sendo observado aumento de 51% no controle, em relação a quantificação realizada em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto para as fontes nítrica e amoniacal, constatou-se redução de 42 e 40% respectivamente (Figura 12B).

3.8 Quantificação de Nitrato e Amônio endógeno

Para ambas as $[\text{CO}_2]$ o teor de NO_3^- foi maior nas folhas e raízes das plantas que receberam a fonte nítrica seguido pelo controle, ao passo que as plantas que receberam a fonte amoniacal foram detectadas apenas vestígios deste íon durante a quantificação (Figuras 13A e B). Nas plantas que receberam NH_4^+ como fonte de N, não houve diferenças estatísticas nas folhas ou raízes para nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 13B). Quando se analisa o efeito do aumento na $[\text{CO}_2]$ para as folhas, houve redução de 73% do teor de NO_3^- nas plantas que receberam a fonte nítrica e 55% para o controle (figura 13A). O contrário foi observado nas raízes, onde houve aumento de 48% para as plantas tratadas com NO_3^- e 30% para o controle (Figura 13B).

Em relação ao teor de NH_4^+ , sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, as folhas das plantas que receberam a fonte amoniacal como tratamento apresentaram maiores teores desse íon, seguido pelo controle, sendo os menores teores observados nas plantas tratadas com NO_3^- (Figura 13C). O mesmo comportamento observado para os teores de NH_4^+ nas raízes em ambas $[\text{CO}_2]$ (Figura 13D). No entanto, com a exposição a $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ apenas as plantas que receberam a fonte amoniacal apresentaram aumento de 23% nos teores de NH_4^+ , enquanto para o controle e as plantas tratadas com NO_3^- a $[\text{CO}_2]$ não interferiu na acumulação deste íon nas raízes de plantas de tabaco (Figura 13D).

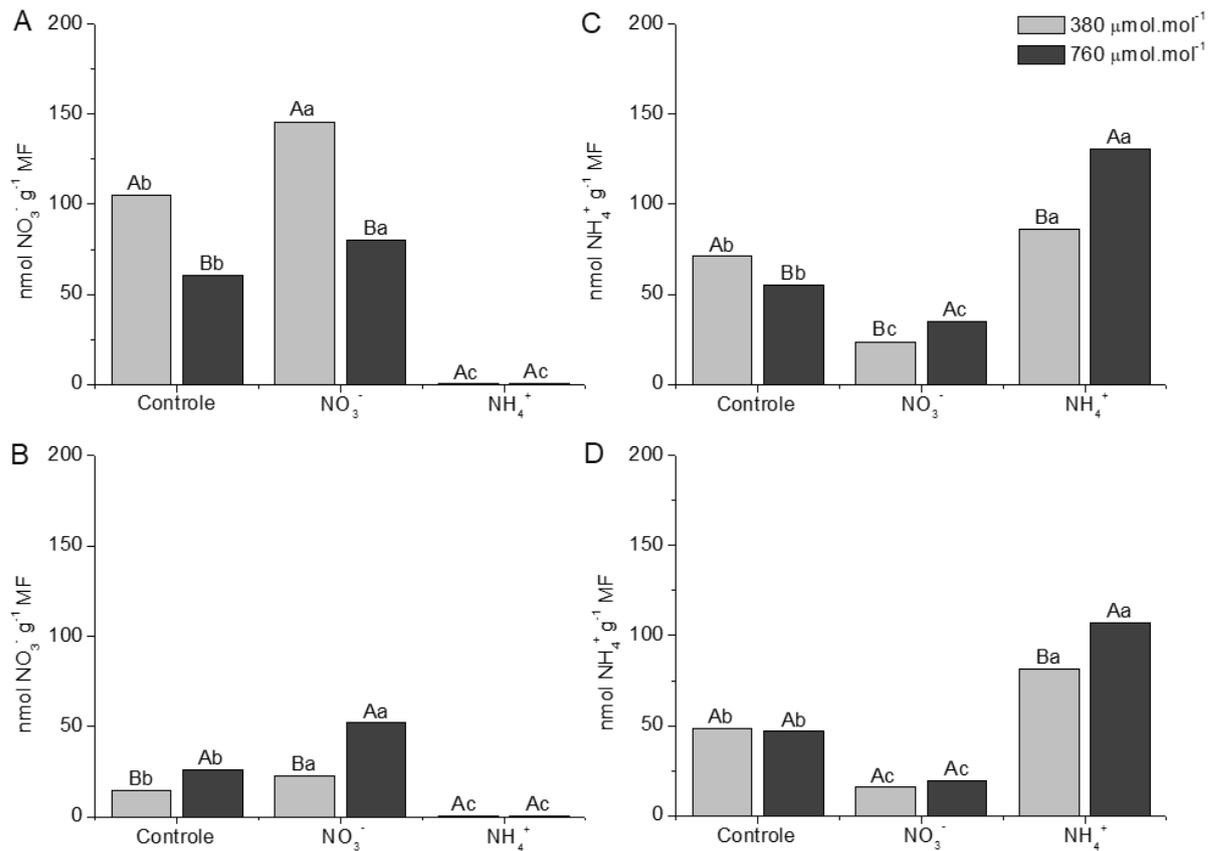


Figura 13. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio no teor de nitrato (NO_3^-) nas folhas (A) e raízes (B) e teor de amônio (NH_4^+) nas folhas (C) e raízes (D) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

3.9 Atividade das isoformas de invertase

Em 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, a atividade da invertase ácida do vacúolo (IAV) nas raízes de plantas de tabaco, não diferiu entre o controle e as plantas tratadas com NH_4^+ , sendo os valores observados para as plantas fertirrigadas com a fonte nítrica em média 25% menor que as demais fontes de N (Figura 14A). Com o aumento na $[\text{CO}_2]$, houve o oposto: a atividade da IAV diminuiu no controle, não foi afetada nas plantas que receberam a fonte amoniacal, mas foi estimulada pela fonte nítrica (Figura 14A).

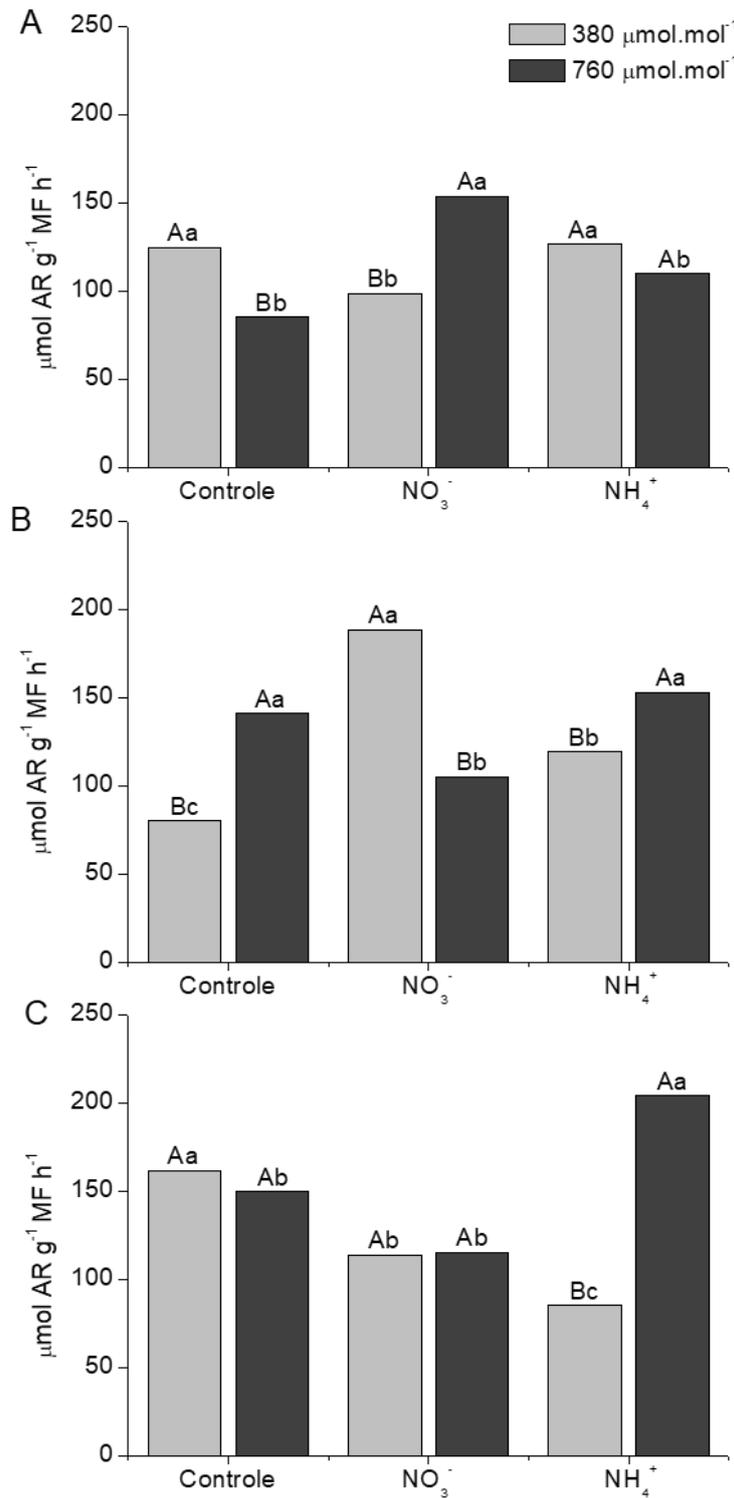


Figura 14. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio na atividade das isoformas de invertase nas raízes de plantas de tabaco. (A) Invertase ácida do vacúolo (IAV); (B) Invertase neutra do citosol (INC) e (C) invertase ácida da parede celular (IAP). As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de N e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, a atividade da enzima invertase neutra do citosol (INC), foi superior nas plantas tratadas com NO_3^- , seguida das plantas que receberam a fonte amoniacal e os menores valores observados para o controle (Figura 14B). O aumento na $[\text{CO}_2]$ favoreceu a atividade da INC no controle e nas plantas fertirrigadas com NH_4^+ , enquanto para as plantas tratadas com NO_3^- houve redução de 44% em relação a atividade observada em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 14B).

A atividade da invertase ácida da parede celular (IAP), foi diferencialmente influenciada entre as fontes de N sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sob essa $[\text{CO}_2]$ o controle apresentou a maior atividade da IAP, seguido pelas plantas tratadas com NO_3^- e a menor atividade constatada para as plantas que receberam a fonte amoniacal (Figura 14C). Com o aumento da $[\text{CO}_2]$, as plantas que receberam NH_4^+ como fonte de N tiveram um aumento expressivo da atividade da IAP, chegando a ser 58% maior do que a observada em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. A $[\text{CO}_2]$, não influenciou a atividade desta enzima nas raízes do controle e das plantas tratadas com NO_3^- (Figura 14C).

3.10 Atividade das enzimas do metabolismo do Nitrogênio

A atividade da enzima redutase do nitrato (RN) em plantas de tabaco, foi influenciada tanto pela fonte de N, quanto pela $[\text{CO}_2]$ (Figura 15). As plantas tratadas com NO_3^- , apresentaram a maior atividade da RN nas folhas e nas raízes durante a exposição a $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, superando em 37% a atividade desta enzima no controle (Figura 15A). Ainda para as folhas, com o aumento na $[\text{CO}_2]$, observou-se redução de 33% da atividade da RN para o controle e de 70% para as plantas tratadas com NO_3^- , embora ainda assim, sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, a fonte nítrica tenha se sobressaído (Figura 15A).

Nas raízes, sob a $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, a maior atividade da RN foi observada nas plantas que receberam a fonte nítrica sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, no entanto, com a submissão das plantas a alta $[\text{CO}_2]$, este tratamento foi superado pelo controle que apresentou maior incremento na atividade da RN nas raízes (Figura 15B). Nas plantas que receberam NH_4^+ como fonte de N, não houve diferenças estatísticas nas folhas ou raízes em nenhuma das avaliações, sendo detectadas apenas uma atividade residual desta enzima (Figura 15).

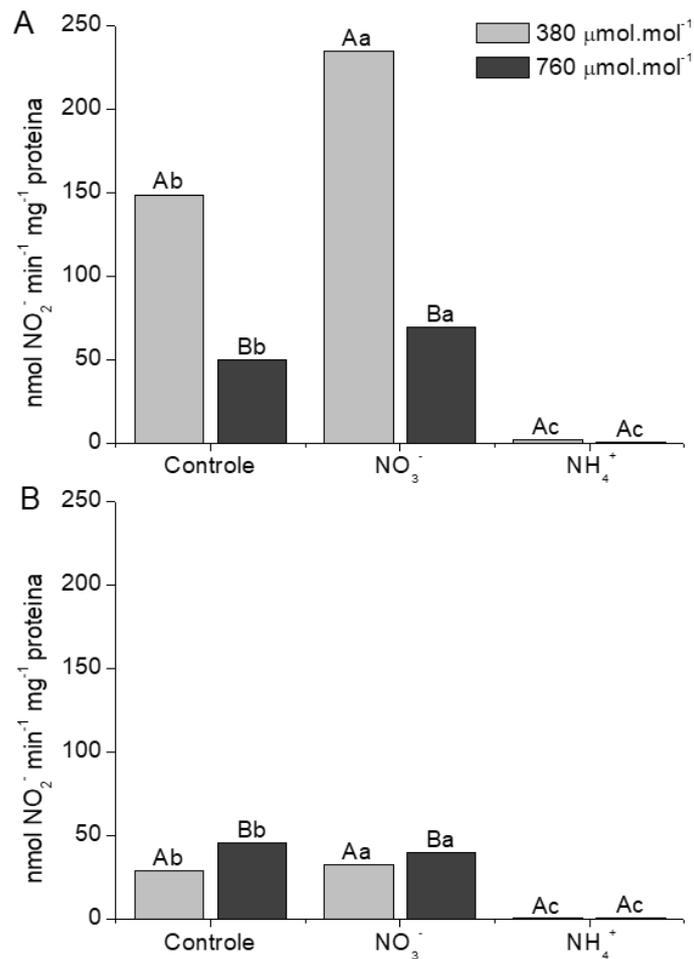


Figura 15. Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de Nitrogênio na atividade da enzima redutase do nitrato (RN) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO₂ dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Para a atividade da enzima glutamina sintase (GS), sob 380 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$, as folhas das plantas tratadas com NO₃⁻ ou com NH₄⁺ não diferiram estatisticamente entre si, superando a atividade desta enzima no controle (Figura 16A). Com o aumento da [CO₂], as folhas das plantas que receberam a fonte amoniacal apresentaram incremento de 38% para a atividade da GS, enquanto nas plantas tratadas com NO₃⁻, observou-se redução de 27%. No controle, a [CO₂] não influenciou a atividade desta enzima (Figura 16A). Nas raízes, a atividade da GS não foi afetada pela fonte de N, embora todos os tratamentos tenham apresentado aumento significativo quando expostos a alta [CO₂] (Figura 16B).

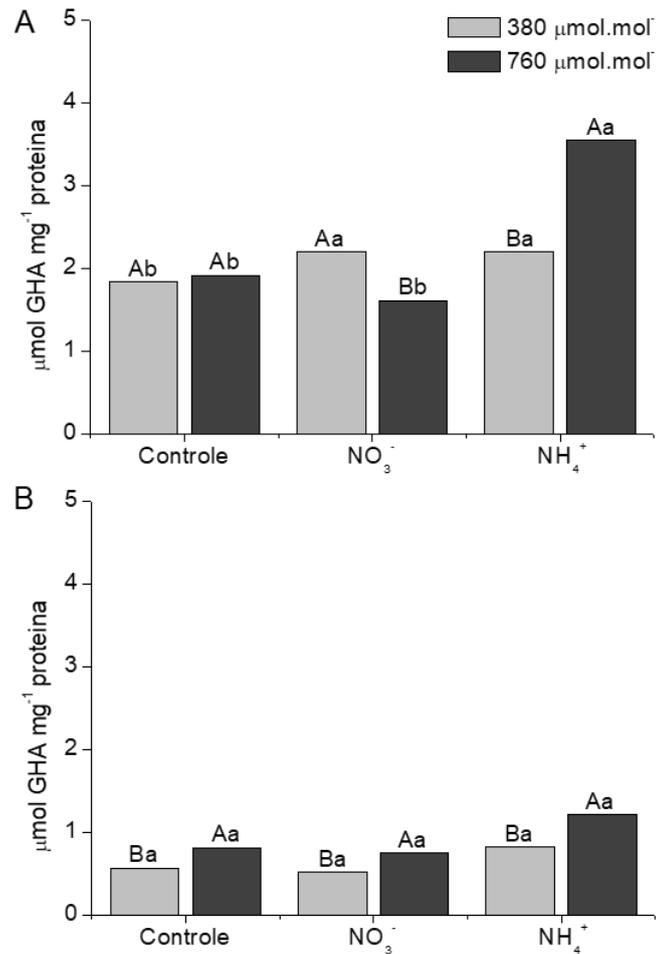


Figura 16. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio na atividade da enzima glutamina sintase (GS) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

A atividade da enzima glutamato sintase (NADPH-GOGAT) foi ensaiada nas raízes de plantas de tabaco (Figura 17). A maior atividade da NADPH-GOGAT sob $380 \mu\text{mol.mol}^{-1}$ foi constatada para as plantas controle, seguida das plantas com NH_4^+ e os menores valores observados para as plantas que receberam a fonte nítrica. Porém, com a exposição das plantas a $760 \mu\text{mol.mol}^{-1}$, houve aumento da atividade da GOGAT nas raízes das plantas tratadas com NH_4^+ e tratadas com NO_3^- , ao passo que para o controle foi observada redução, embora não tenham sido constatadas diferenças estatísticas entre NO_3^- e controle sob alta $[\text{CO}_2]$ (Figura 17).

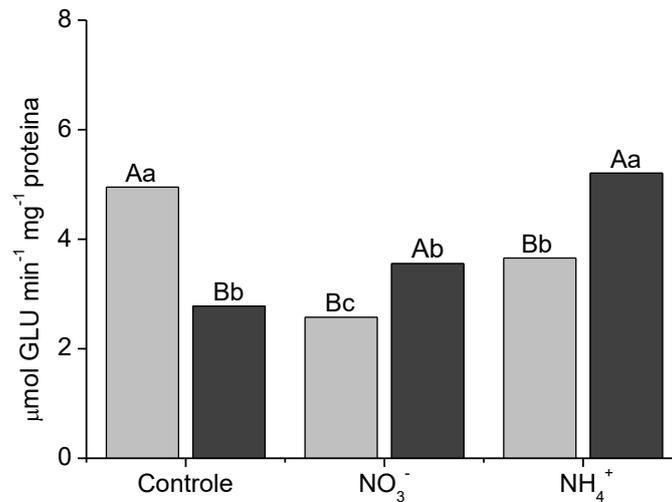


Figura 17. Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de Nitrogênio na atividade da enzima glutamato sintase (GOGAT) em raízes de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO₂ dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Nas folhas a atividade da enzima glutamato desidrogenase no sentido de síntese de GLU (GDH), foi afetada pela fonte N em 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 18A). Nas plantas que receberam a fonte amoniacal, a atividade da GDH foi 32% maior que a constatada para as plantas que receberam a fonte nítrica e 49% maior que os valores observados para o controle. Com a exposição a alta [CO₂], a atividade da GDH não diferiu entre as plantas tratadas com NO₃⁻ e NH₄⁺, sendo o controle a apresentar os menores valores de atividade desta enzima. No entanto, quando se analisa o efeito da [CO₂] na fonte de N, as plantas tratadas com NH₄⁺ apresentaram redução de 17% na atividade da GDH, enquanto para os demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas (Figura 18A). Nas raízes, as maior atividade da GDH sob 380 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ foram constatadas nas plantas que receberam a fonte amoniacal, ao passo que o controle e as plantas tratadas com NO₃⁻ não difeririam significativamente entre si (Figura 18B). O aumento da [CO₂], afetou negativamente a atividade da GDH nas raízes das plantas tratadas com NH₄⁺, enquanto para o controle e as plantas que receberam a fonte nítrica não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 18B).

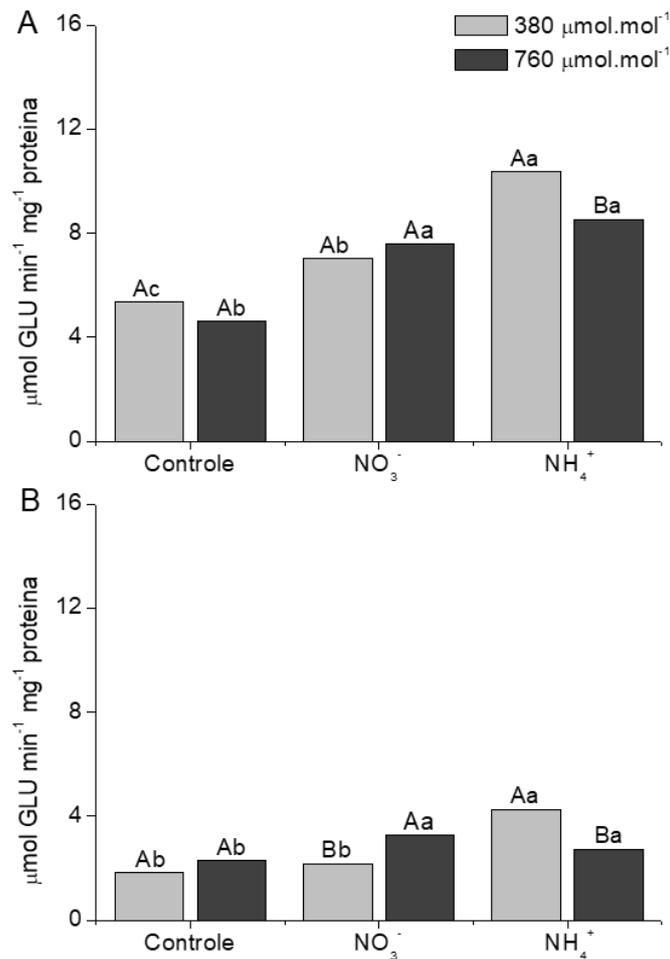


Figura 18. Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de Nitrogênio na atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO₂ dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

3.11 Atividade das enzimas do metabolismo antioxidante, conteúdo de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica

Sob 380 μmol.mol⁻¹, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas folhas não diferiu entre as fontes nítricas e amoniacal, sendo a menor atividade observada para o controle (Figura 19A). Com a exposição das plantas a 760 μmol.mol⁻¹, a atividade da SOD nas folhas aumentou em todas as fontes N e os maiores valores foram observados para as plantas tratadas com NO₃⁻, seguido das plantas que receberam NH₄⁺ e os menores valores observados para o controle. Quando se compara o efeito do aumento na [CO₂], houve incremento de 33% para as plantas que receberam a fonte nítrica, 30% para o controle e 13% para as plantas tratadas com NH₄⁺ (Figura 19A). Nas raízes, assim como observado nas folhas, a atividade da SOD sob 380

$\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, não diferiu entre as fontes nítrica e amoniacal, sendo maiores que a atividade constatada para o controle (Figura 19B). Com o aumento da $[\text{CO}_2]$, as plantas tratadas com NH_4^+ apresentaram um incremento de 55% da atividade desta enzima, em relação aos valores observados em $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto nas plantas que receberam a fonte nítrica esse aumento foi de 20%. Para o controle não houve efeito significativo da $[\text{CO}_2]$ (Figura 19B).

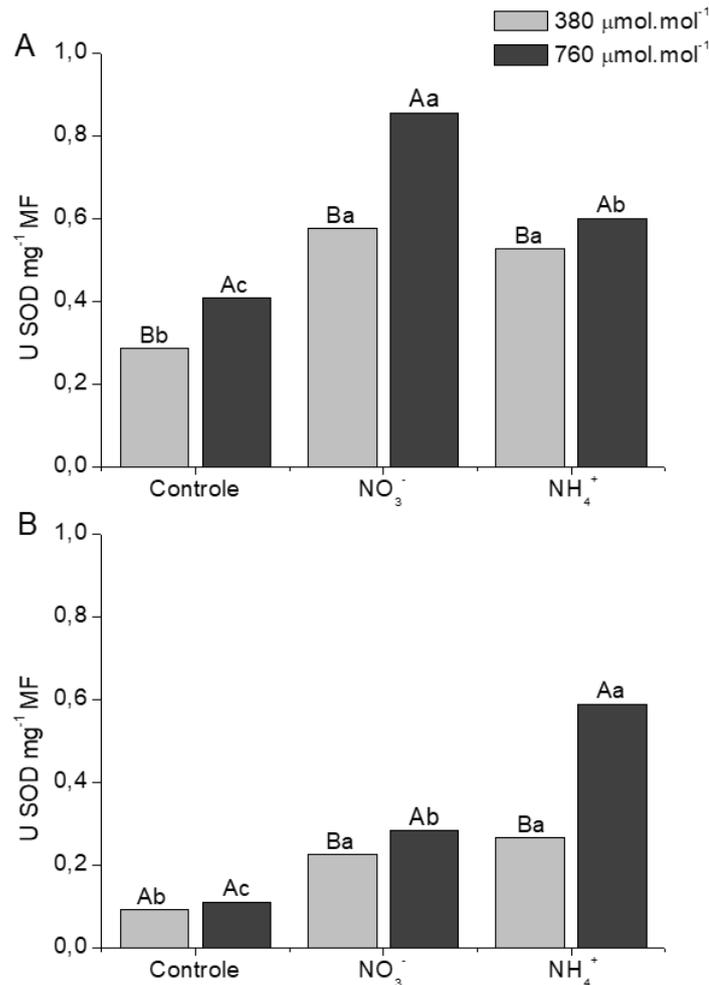


Figura 19. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste Scott-Knott.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas das plantas de tabaco, não diferiu significativamente entre as fontes de N sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 20A). O contrário foi observado para o aumento da $[\text{CO}_2]$ onde o conteúdo de H_2O_2 aumentou em 35% para as plantas tratadas com NO_3^- , 25% para as plantas que receberam a fonte amoniacal, ao passo que houve redução de 40% no controle. Nas raízes, sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, o maior conteúdo de H_2O_2 foi

constatado nas plantas tratadas com NH_4^+ , ao passo que o controle e as plantas que receberam a fonte nítrica, não apresentaram diferenças significativas (Figura 20B). Com exposição das plantas a $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, houve incremento no conteúdo de H_2O_2 para o controle e para a fonte nítrica, enquanto para as plantas tratadas com NH_4^+ a concentração de CO_2 não interferiu no acúmulo de H_2O_2 na raiz (Figura 20B).

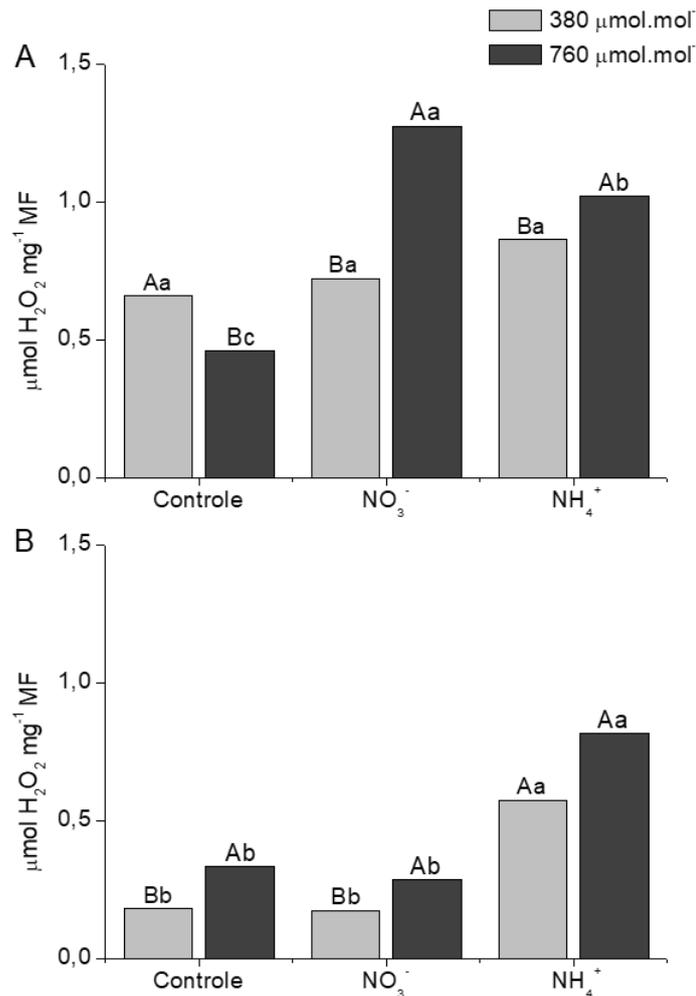


Figura 20. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio no conteúdo de peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Para a atividade da enzima catalase (CAT) nas folhas, sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, entre as plantas tratadas com NO_3^- ou NH_4^+ não foram observadas diferenças significativas, sendo a menor atividade constatada para o controle (Figura 21A). No entanto, para todas as fontes de N houve incremento da atividade da CAT com a exposição a alta $[\text{CO}_2]$, sendo os maiores valores observados para as plantas tratadas com NH_4^+ , como aumento de 63% em relação aos valores

obtidos para essa mesma fonte sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, seguido das plantas que receberam a fonte nítrica onde constatou-se aumento de 40% e pelo controle que aumentou 39% (Figura 21A).

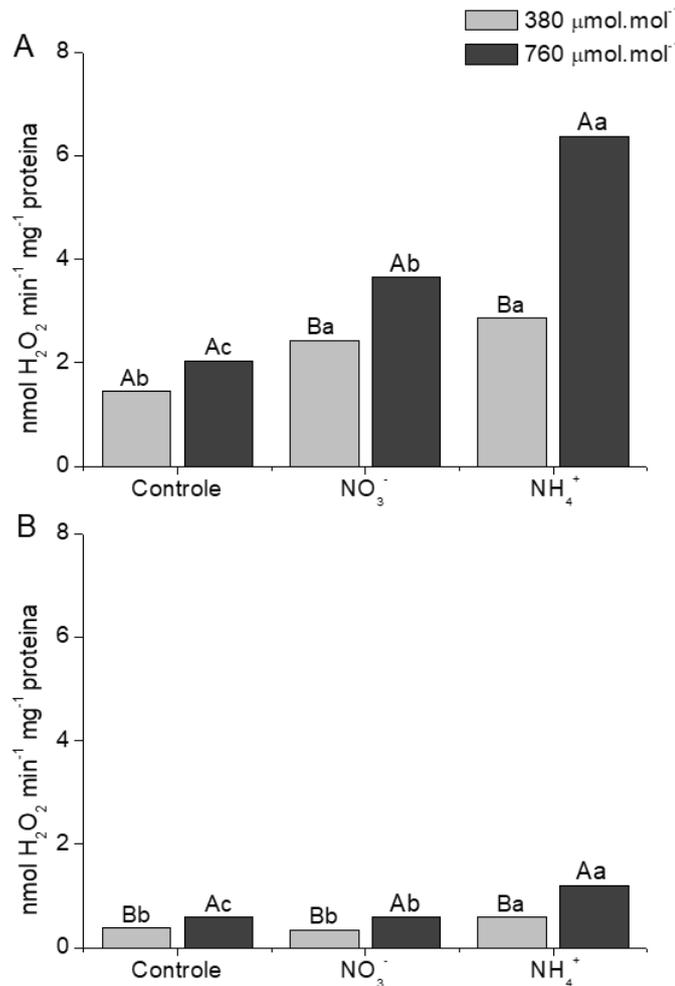


Figura 21. Efeito da concentra o de CO₂ e da fonte de Nitrogênio na atividade da enzima catalase (CAT) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentra es de CO₂ dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentra o de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Nas raízes, sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, a maior atividade da CAT foi obtida nas plantas que receberam a fonte amoniacal, ao passo que o controle e as plantas tratadas com NO₃⁻, não diferiram estatisticamente (Figura 21B). Com o aumento da [CO₂], observou-se incremento da atividade da CAT para todas as fontes de N, sendo os maiores valores observados para as plantas tratadas com NH₄⁺, seguido do NO₃⁻, e os menores valores constatados para o controle (Figura 21B).

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) nas folhas sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, não diferiu estatisticamente entre as plantas tratadas com a fonte nítrica e amoniacal, sendo a menor atividade observada para o controle (Figura 22A). Com o aumento da $[\text{CO}_2]$ os maiores valores de atividade da APX foram constatados para as plantas tratadas com NO_3^- , ainda para esse tratamento, observou aumento de 45% em relação aos valores obtidos sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, seguido de aumento de 18% para o controle e redução de 57% nas plantas tratadas com NH_4^+ .

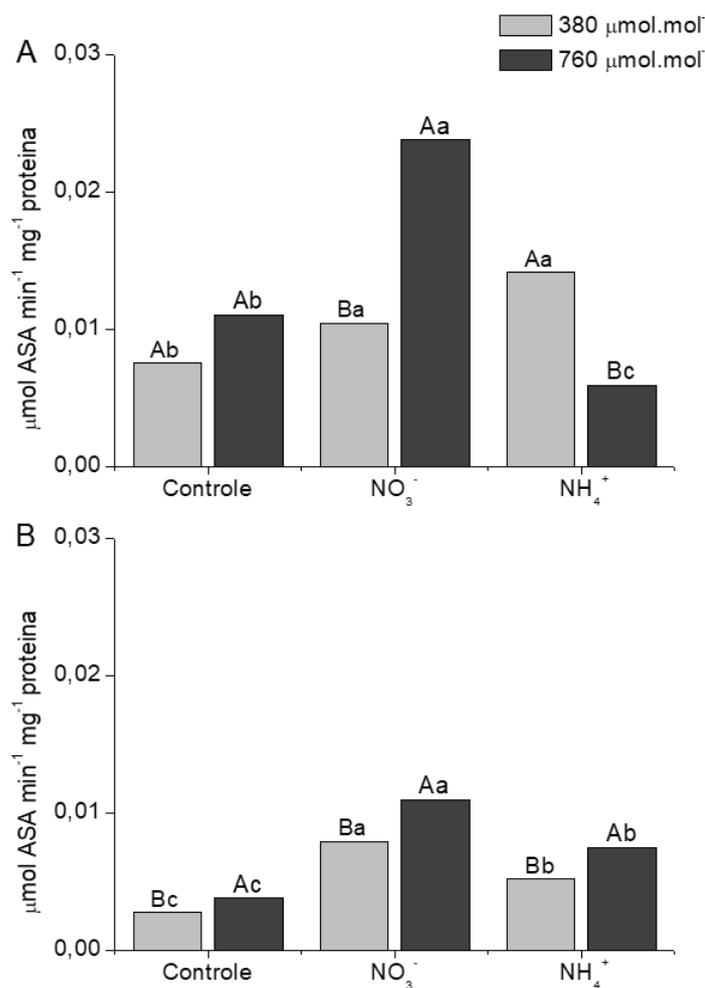


Figura 22. Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de Nitrogênio na atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO_2 dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

Nas raízes, em ambas as $[\text{CO}_2]$, as plantas tratadas com NO_3^- tiveram a maior atividade da APX, seguido pelas plantas que receberam a fonte amoniacal e os menores valores observados para o controle (Figura 22B). O aumento da $[\text{CO}_2]$, estimulou a atividade desta

enzima para todas as fontes de N, havendo incremento de 27% para as plantas que receberam a fonte nítrica e amoniacal, ao passo que no controle observou-se aumento de 25%.

Entre as fontes de N, as plantas que receberam a fonte amoniacal, apresentaram maiores valores de peroxidação lipídica sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ tanto nas folhas (Figura 23A), quanto nas raízes (Figura 23B). Com a exposição das plantas ao aumento da $[\text{CO}_2]$, no controle e nas plantas tratadas com NO_3^- , observou-se aumento significativo deste parâmetro nas folhas, ao passo que para a fonte amoniacal houve redução. Quando se compara a fonte de N sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, nas folhas (Figura 23A) os maiores valores foram obtidos para a fonte nítrica, ao passo que nas raízes (Figura 23B) não foram observadas diferenças significativas.

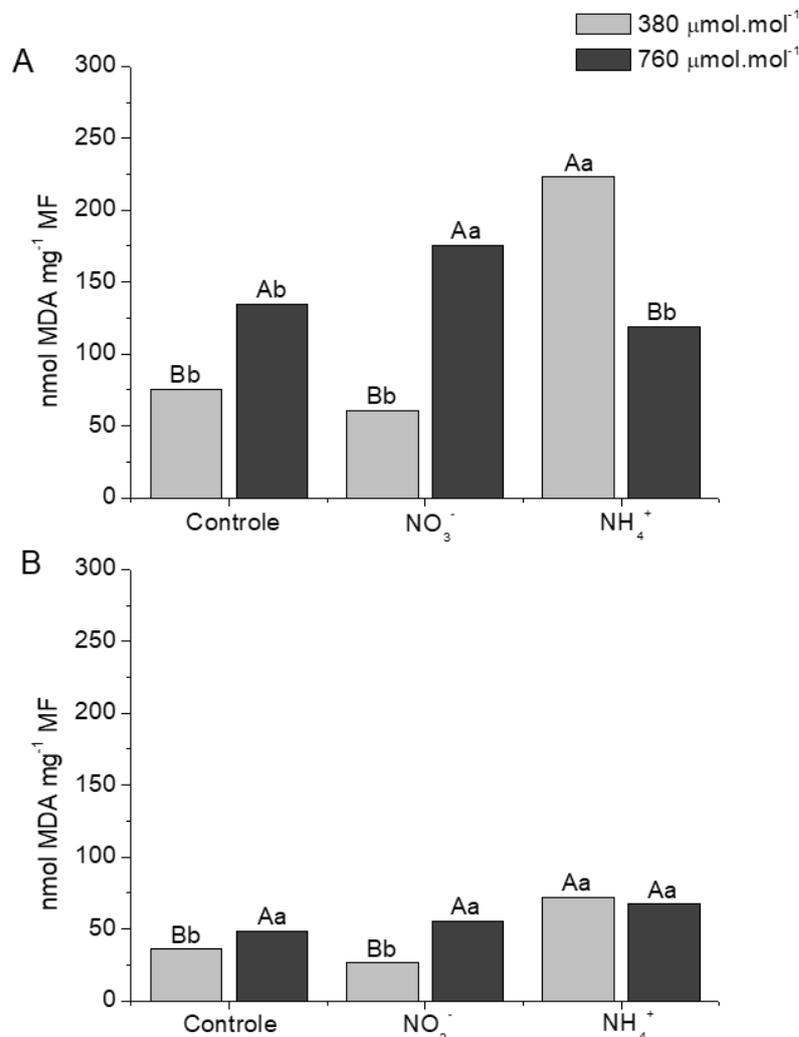


Figura 23. Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de Nitrogênio na peroxidação lipídica em folhas (A) e raízes (B) de plantas de tabaco. As letras maiúsculas comparam o efeito das concentrações de CO₂ dentro da fonte de Nitrogênio e letras minúsculas comparam as fontes de Nitrogênio em cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0.05$) pelo teste Scott-Knott.

4 DISCUSSÃO

A fonte de Nitrogênio (N) fornecida influenciou o crescimento e a morfologia das plantas de tabaco de forma distinta sob concentração de $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Entre os parâmetros avaliados neste estudo, a estimulação do acúmulo de matéria seca total (MS) (Figura 2A), nas raízes (Figura 2B) e a maior taxa de crescimento relativo (TCR) (Figura 2C) das plantas controle fertirrigadas com solução nutritiva completa (NO_3^- ; $14 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e NH_4^+ , $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) podem estar relacionadas ao efeito benéfico do sinergismo entre nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) na proporção adequada (ZHANG et al., 2007), estimulando o crescimento além do observado quando apenas uma fonte inorgânica de N é fornecida (BRITTO; KRONZUCKER, 2002). De fato, muitas espécies de plantas apresentam sintomas de toxicidade quando submetidas a fertilização com apenas NH_4^+ , ao passo que esses sintomas são atenuados nas plantas cultivadas com NO_3^- como fonte exclusiva de N (HORCHANI; HAJRI; ASCHI-SMITI, 2010). Isto foi observado neste trabalho onde, as plantas fertirrigadas com NO_3^- , apresentaram melhor desempenho de crescimento, quando comparadas as plantas que receberam apenas NH_4^+ (Figuras 2A; 2B; 2C). A maior razão raiz/parte aérea (Figura 2D) para a concentração de $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, também foi observada no controle seguindo as tendências de desempenho de crescimento entre as fontes de N mencionadas acima.

Quando as plantas de tabaco foram submetidas a alta concentração de CO_2 ($[\text{CO}_2]$; $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) a aceleração do crescimento e o aumento da biomassa foi diferencialmente influenciado pelas fontes nitrogenadas, salientando que os efeitos da forma de N que as plantas estão absorvendo do solo podem ser tão importantes para o desempenho de crescimento quanto os efeitos da alta $[\text{CO}_2]$. Nas plantas fertirrigadas com amônio (NH_4^+ ; $16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e no controle houve incremento de biomassa em resposta ao aumento da $[\text{CO}_2]$, ao passo que este parâmetro foi marcadamente atenuado nas plantas fertirrigadas com nitrato (NO_3^- ; $16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 2). Estes resultados indicam que as respostas das plantas a alta $[\text{CO}_2]$ dependem da coordenação entre o metabolismo do Carbono (C) e N e ainda, das implicações metabólicas inerentes a fonte inorgânica de N que está sendo absorvida e assimilada.

O aumento da $[\text{CO}_2]$ geralmente culmina com o incremento da área foliar, devido ao crescimento dos tecidos constituintes do mesofilo, como parênquimas, epiderme e tecidos vasculares (DERMODY et al., 2006). No presente estudo, observou-se aumento da espessura total do mesofilo (EM) para todas as fontes de N quando submetidas a alta $[\text{CO}_2]$, com maiores valores observados para as plantas tratadas com NH_4^+ (Figura 4; Tabela 2). A maior EM permitiria o aumento da deposição de C por unidade de área foliar (MASLE, 2000), que em

última instância, ajuda a compensar o desequilíbrio fonte-dreno observado em plantas C3 expostas a alta $[CO_2]$, impedindo o efeito *feedback* negativo na fotossíntese ocasionado pelo acúmulo de carboidratos não estruturais (LONG et al., 2004). Assim, o aumento da EM observada nas plantas que receberam a fonte amoniacal provavelmente contribuiu, entre outros fatores, para a maior taxa fotossintética observada neste tratamento durante a exposição a $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 7A). Além disso, todas as fontes nitrogenadas aumentaram o comprimento dos tricomas glandulares em resposta a alta $[CO_2]$ (Figura 5). Os tricomas glandulares possuem células metabolicamente ativas, com a capacidade de secretar ou estocar grandes quantidades de metabólitos especializados (TISSIER, 2012). Essa característica torna os tricomas glandulares comercialmente importantes, já que esses metabólitos podem ser alcaloides de interesse comercial, sendo a alta $[CO_2]$ um elicitador na produção desses compostos (GLAS et al., 2012).

Neste trabalho, observou-se que a funcionalidade estomática (FUN) (Tabela 2) considerada como a relação diâmetro polar/diâmetro equatorial dos estômatos (CASTRO et al., 2009), diminuiu no controle e nas plantas tratadas com NO_3^- . Embora a FUN nas plantas tratadas com NH_4^+ não tenha sido influenciada pela $[CO_2]$, nessas plantas observou-se aumento da densidade estomática (DE) (Tabela 2; Figura 3) e da condutância estomática (g_s) (Figura 7B) durante a exposição a $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. O poro estomático se abre em resposta às reduções no potencial osmótico e, conseqüentemente, no potencial hídrico das células-guarda, o que culmina na entrada de água nessas células e abertura estomática (KOLLIST; NUHKAT; ROELFSEMA, 2014). Fisiologicamente, a maior g_s (Figura 7B) nas plantas que receberam NH_4^+ como fonte de N, pode ser atribuída ao fato que durante exposições a maiores quantidades desse íon, há uma maior assimilação NH_4^+ nas folhas, acidificando o pH citoplasmático (HACHIYA; SAKAKIBARA, 2016). Esta acidez estimula atividade de bombas H^+ -ATPases (HEDRICH et al., 2001) impedindo que ocorra a despolarização da membrana plasmática e a elevação do Cálcio (Ca^{2+}) citosólico em resposta ao hormônio ácido abscísico (ABA) (WILKINSON; DAVIES, 2002) culminando com a permanente abertura estomática. Assim, nas plantas fertirrigadas com NH_4^+ , a diminuição da FUN pode ter sido compensada pelo aumento da DE (Tabela 2; Figura 3) verificada neste tratamento, influenciando positivamente as trocas gasosas em resposta ao aumento na $[CO_2]$ (Figura 7A; 7B; 7C e 7F). Em contrapartida, a maior g_s está relacionada ao aumento da taxa transpiratória (E ; figura 7C), o que possivelmente levou a uma menor eficiência instantânea no uso da água (A/E ; figura 7D) para este tratamento em relação as plantas controle e as que receberam a fonte nítrica durante a exposição a alta $[CO_2]$.

As respostas fisiológicas ao aumento da $[CO_2]$ das plantas fertirrigadas com NH_4^+ descritas até aqui, contrariam efeitos consistentes do crescimento de plantas C3 sob alta $[CO_2]$, como por exemplo a diminuição da g_s (AINSWORTH; ROGERS, 2007; NORBY et al., 1999), levando a uma diminuição da concentração de carbono interno (WONG, 1990) redução da transpiração (DEL POZO et al., 2007) e conseqüentemente uma diminuição gradativa das taxas fotossintéticas (KANEMOTO et al., 2009; LONG et al., 2004). Esses efeitos são conhecidos como aclimação fotossintética a alta $[CO_2]$. Neste trabalho, o controle e as plantas cultivadas com NO_3^- como fonte de N, apresentaram mais suscetíveis a aclimação fotossintética, enquanto nas plantas tratadas com NH_4^+ a fotossíntese foi estimulada em alta $[CO_2]$ (Figura 7A). O aumento das taxas fotossintéticas (A) observadas para o primeiro dia de avaliação em $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, revelou que num primeiro momento, independente da fonte de N, as plantas de tabaco respondem ao aumento na $[CO_2]$, com incremento na assimilação líquida de C, no entanto, esse efeito decresce ao longo dos dias e o rápido acúmulo de amido em cloroplastos, como resultado de um desequilíbrio fonte-dreno, tem sido apontado como um dos motivos (KITAOKA et al., 2016; LONG et al., 2004).

Isto se aplica as plantas controle neste experimento, onde altos teores de amido foram observados nas folhas quando submetidas a alta $[CO_2]$ (Figura 8A). Porém, esse mecanismo de aclimação por si só não explicaria a redução da A nas plantas tratadas com NO_3^- , uma vez que nessas plantas houve redução significativa dos teores de amido folhas com o aumento da $[CO_2]$ (Figura 8A), o que significa que provavelmente mecanismos fisiológicos subjacentes a absorção de NO_3^- , comprometeram o desempenho fotossintético neste tratamento.

Apesar de contraditória, as diferenças encontradas nas plantas tratadas com NO_3^- , em relação aos motivos que levaram a aclimatização fotossintética, podem estar relacionadas a diminuição da condutância estomática (g_s) (Figura 7B) e conseqüentemente ao decréscimo da taxa transpiratória (E) (Figura 7C) diminuindo a capacidade em manter o fluxo transpiratório neste tratamento. A manutenção da E é fundamental tanto para a absorção quanto para o transporte de NO_3^- por fluxo de massa até as folhas, onde grande parte desse íon é assimilado (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013). Neste trabalho, constatou-se um menor teor de NO_3^- (Figura 13A), e menor atividade da redutase do nitrato (RN) (Figura 15A) nas folhas das plantas que receberam a fonte nítrica sob alta $[CO_2]$. Teoricamente, a redução de uma fonte de N utilizável pelas plantas tratadas com NO_3^- , pela diminuição da absorção e transporte desse íon por fluxo de massa, resultaria na extinção de um forte dreno competidor por produtos fotoquímicos e esqueletos de C (BLOOM et al., 2010). Isso implica em super redução celular e conseqüentemente maior dissipação não fotoquímica de elétrons (HYMUS; BAKER; LONG,

2001). De fato, nas plantas que receberam a fonte nítrica constatou-se a menor eficiência fotoquímica (Fv/Fm; Tabela 4) e maior atividade da ascorbato peroxidase (APX) (Figura 22A) em relação aos demais tratamentos sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. A APX é considerada a enzima mais importante da eliminação de peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) no cloroplasto. Essa enzima utiliza ascorbato como seu doador de elétrons para reduzir H_2O_2 à água e Oxigênio, fazendo parte do ciclo ascorbato-glutationa (NAKANO; ASADA, 1981). Embora sob condições ótimas, a alta $[\text{CO}_2]$ aumente o uso de energia fotoquímica diminuindo a probabilidade de fotoinibição, o contrário é verdadeiro para as condições onde a disponibilidade de N é limitada (HYMUS; BAKER; LONG, 2001).

Por outro lado, existem evidências que a inibição da fotorrespiração como consequência do aumento da $[\text{CO}_2]$, afeta negativamente a assimilação do NO_3^- em folhas de plantas C3 (BLOOM et al., 2004). Neste trabalho, houve redução da taxa fotorrespiratória (FR) no controle e nas plantas tratadas com NO_3^- (Figura 7F). Uma vez que a fotorrespiração estimula a exportação de malato a partir dos cloroplastos (TANIGUCHI; MIYAKE, 2012), isso aumentaria a disponibilidade de NADH no citoplasma que pode ser usado como substrato pela enzima RN (TANIGUCHI; MIYAKE, 2012). Como consequência, uma diminuição da FR reduziria a quantidade de poder redutor disponível para redução do NO_3^- (BLOOM et al., 2010, 2014). Como mencionado anteriormente, a atividade da RN nas folhas das plantas de tabaco submetidas a alta $[\text{CO}_2]$, diminuiu significativamente no controle e nas plantas que receberam a fonte nítrica, em relação a atividade desta mesma enzima sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 15A). Esta redução pode estar associada tanto a ausência do substrato (NO_3^-) ocasionada pela diminuição da taxa transpiratória (Figura 7C) e consequentemente do fluxo de massa, quanto da incapacidade bioquímica de atender a demanda energética da conversão de NO_3^- a nitrito (NO_2^-) pela diminuição da FR (Figura 7F). Apesar de mecanismos distintos é possível que estejam agindo sinergicamente, pois para ambos foram encontradas evidências neste trabalho (Figuras 7A, 7B, 7F e 13A).

Com o avanço dos recursos técnicos dos analisadores portáteis de CO_2 , tornou-se possível a avaliação da FR, a partir das medidas das trocas gasosas. Essa técnica, apesar de possuir limitações em relação à determinação exata da intensidade da fotorrespiração, mostrou-se bem adaptada para a realização de estudos comparativos (DURING, 1988). As taxas de FR observadas neste trabalho revelaram que, embora as estimativas tenham apontado uma diminuição no controle e nas plantas tratadas com NO_3^- , houve manutenção da FR para o tratamento com a fonte amoniacal (Figura 7F), o que pode ter sido fundamental para a melhor utilização do NH_4^+ como fonte de N. Em estudo com *Arabidopsis thaliana*, verificou-se que o

decréscimo da FR pelo aumento da $[\text{CO}_2]$ retardou o crescimento de plantas fertilizadas com NO_3^- , enquanto nas plantas tratadas com NH_4^+ as taxas de crescimento foram mantidas (BLOOM et al., 2012). A manutenção da FR nas plantas tratadas com NH_4^+ mesmo sob aumento da $[\text{CO}_2]$, também pode ser suportada pelos dados obtidos neste trabalho para o maior conteúdo de H_2O_2 e maior atividade da enzima catalase (CAT) nas folhas sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figuras 20A; 21A). O H_2O_2 é formado no peroxissomo pela atividade da enzima da via fotorrespiratória glicolato oxidase, sendo convertido em água (H_2O) e oxigênio (O_2) pela atividade da CAT em plantas superiores e outros organismos (DIETZ; MITTLER; NOCTOR, 2016). Nas folhas, o aumento da atividade da CAT (Figura 21A) nas plantas que receberam a fonte amoniacal, certamente foi essencial para manutenção do conteúdo de H_2O_2 a taxas toleráveis.

Fisiologicamente, o baixo desempenho das plantas controle e as fertirrigadas com NO_3^- sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ neste trabalho, pode estar relacionado a uma diminuição substancial FR e consequentemente de glicina, serina e glutamato, como observado em estudo com plantas nutridas com NO_3^- e submetidas a alta $[\text{CO}_2]$ (FERRARIO-MÉRY et al., 1997). Em condições atmosféricas de $[\text{CO}_2]$, a oxigenação da Rubisco favorece o desvio desses aminoácidos (AA) da via fotorrespiratória cíclica (MISRA, 2014), que podem ser usados para produção de novos aminoácidos que serão transportados de folhas completamente expandidas para tecidos em crescimento (FOYER; PARRY; NOCTOR, 2003). Isso pode ser confirmado em estudo onde aminoácidos como a serina e o glutamato, gerados durante a reciclagem de C e N pela fotorrespiração, foram componentes significativos dos exsudatos do floema (ZIEGLER, 1975), desafiando a noção de que o C é reciclado de forma conservadora por uma via fotorrespiratória cíclica. Complementando essa teoria, Madore; Grodzinski, (1984) usando ^{14}C , mostraram que durante a fotorrespiração, glicina, serina e outros aminoácidos são isotopicamente marcados em quantidades significativas e podem ser transportados a partir da folha. Os mesmos autores ainda relatam um forte aumento na marcação isotópica de aminoácidos, particularmente de glicina e serina, com aumento da concentração de O_2 , correlacionando o aumento da síntese e transporte de aminoácidos com maiores taxas FR. Assim, as taxas FR observadas para as plantas que receberam a fonte amoniacal (Figura 7F) podem ter sido fundamentais para a distribuição de N para os tecidos em crescimento, favorecendo o rápido acúmulo de biomassa observado para esse tratamento sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 2C). Além disso, a limitação pela utilização de triose-fosfato (*TPU*; Tabela 3) foi superior nas plantas tratadas com NH_4^+ sob ambas $[\text{CO}_2]$ sustentando a ocorrência de desvio do C fotorrespiratório neste tratamento. Esse parâmetro, considera que limitação da A pela *TPU* ocorre porque a liberação de fosfato inorgânico (Pi) no

citoplasmático não consegue acompanhar a sua taxa de incorporação em triose-fosfato no estroma do cloroplasto. No processo fotorrespiratório, há liberação do Pi da molécula formada pela atividade oxigenase da Rubisco - o 2-fosfoglicolato (2PG) - pela enzima fosfoglicolato fosfatase dentro do próprio cloroplasto, diminuindo a disponibilidade de Pi citosólico (SHARKEY, 2016).

Por todas as razões mencionadas anteriormente e com base nos resultados obtidos nesse trabalho para diminuição do NO_3^- endógeno (Figuras 7C; 13A; 15A) como fonte de N utilizável nas folhas de plantas de tabaco, é possível supor que um dos motivos pelo qual a utilização de NH_4^+ tenha se sobressaído em relação a fonte nítrica, seja o fato de que mesmo sob alta $[\text{CO}_2]$ esse íon continua a ser assimilado e redistribuído entre diferentes órgãos da planta. Em parte, isso se deve a existência de um aparato metabólico, que normalmente suporta a reassimilação do NH_4^+ fotorrespiratório, tenha sido fundamental tanto para evitar a toxidez deste íon como suprir a ausência do NO_3^- diante da demanda da planta por compostos nitrogenados. Neste contexto, apoiando essas considerações, a atividade das enzimas glutamina sintase (GS) responsável pela reassimilação do NH_4^+ gerado pela via fotorrespiratória, aumentou substancialmente nas folhas das plantas tratadas com a fonte amoniacal sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, diminuiu nas plantas que receberam a fonte nítrica, ao passo que não houve diferenças significativas para a $[\text{CO}_2]$ no controle. A alta atividade da GS nas folhas, confirmaria um melhor aproveitamento de NH_4^+ como fonte de N, seja ele oriundo da via fotorrespiratória ou da absorção deste íon pelas raízes estimulada pelo aumento da $[\text{CO}_2]$ (Figuras 16 e 13D). Como consequência, seria esperado que o teor de AA nas folhas aumentassem com a exposição a $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, no entanto, foi observada redução deste parâmetro em todos os tratamentos, embora possivelmente por razões fisiológicas distintas (Figura 12A).

Para as plantas tratadas com NH_4^+ , é preciso considerar que os maiores teores de AA foram constatados para esse tratamento independente da $[\text{CO}_2]$. Sob $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, a maior síntese de AA provavelmente foi uma estratégia para neutralizar os efeitos tóxicos de altos teores de NH_4^+ nos tecidos e que pode ser suportada pelo fornecimento de esqueletos de C. Isso pode ser confirmado pelos resultados obtidos para atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH), uma vez que esta enzima trabalha no sentido de síntese de glutamato apenas quando a concentração endógena de NH_4^+ é alta, como observado neste tratamento (Figura 13C; 18A e 18B). Em estudo sobre os efeitos das fontes inorgânicas de N no teor de AA em trigo, constatou-se que o aumento do AA asparagina foi a principal estratégia de desintoxicação nas plantas que foram tratadas com fonte amoniacal (TILLS; ALLOWAY, 1981). Por outro lado, sob $760 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, houve redução do teor de AA nas folhas (Figura 18A), possivelmente em

consequência a uma diluição provocada pelo rápido crescimento verificado para este tratamento (Figura 2C) em resposta ao aumento de A (Figura 7A), dos teores de sacarose (Figura 9A) e açúcares redutores (AR) (Figura 10A), assim com uma maior disponibilidade de esqueletos de C, é possível presumir que houve um maior investimento em carboidratos estruturais, bem como uma maior síntese de proteínas.

De fato, os maiores teores de proteínas nas folhas foram observados para as plantas tratadas com NH_4^+ sob exposição a alta $[\text{CO}_2]$, enquanto para o controle e as plantas que receberam a fonte nítrica foi observada redução (Figura 11A). Plantas C3, normalmente investem até 50% da proteína foliar em Rubisco, o que representa cerca de 25% do nitrogênio da folha (WHITNEY et al., 2015). Esse aumento da proteína foliar para as plantas que receberam a fonte amoniacal, pode ter contribuído para a maior velocidade de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) (Tabela 3) maior utilização de elétrons na regeneração da RuBP (J) e maior eficiência fotoquímica (Fv/Fm; Tabela 4). Para os dois últimos parâmetros especialmente, o aumento no teor de proteína pode estar relacionado ao um investimento de C e N em componentes fotoquímicos estruturais. Em plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas a déficit hídrico, a V_{cmax} foi menos afetada em plantas cultivadas com NH_4^+ , do que em plantas que receberam a fonte nítrica (GUO et al., 2007). O déficit hídrico assim como a aclimação fotossintética a alta $[\text{CO}_2]$, possuem respostas fisiológicas semelhantes no que diz respeito a diminuição da g_s e conseqüente diminuição do fluxo de massa responsável pela absorção e transporte de NO_3^- para a parte aérea, deste modo, a maior integridade do aparato fotossintético das plantas de arroz para o tratamento com NH_4^+ , pode estar relacionada aos processos metabólicos que tornaram este íon uma fonte de N mais acessível, assim como verificado neste trabalho.

Embora pareça contraditório, a maior V_{cmax} (Tabela 3) foi observada para tratamento com NH_4^+ , o mesmo a apresentar a maior FR (Figura 7F). Diferentes trabalhos têm demonstrado que melhorar o fluxo de metabólitos fotorrespiratórios, pode aumentar o desempenho fotossintético (HUANG; HU; ZHANG, 2015; IGAMBERDIEV et al., 2001; JAUREGUI et al., 2015; TIMM et al., 2008; VOSS et al., 2013; ZHU; LONG; ORT, 2010). Além disso, o maior teor de proteínas das plantas tratadas com NH_4^+ , em relação aos demais tratamentos sob 760 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figura 11A), provavelmente promoveram um incremento nos teores de Rubisco, o que resultou em aumento quantitativo da FR.

De acordo com o modelo de fotossíntese de Farquhar et al. (1980), a assimilação de CO_2 em plantas C3 é restringida pela carboxilação e/ou regeneração da RuBP. Portanto, com base nesse modelo, o passo limitante pode ser alterado de duas maneiras: (1) ajustes no equilíbrio

entre as taxas máximas de regeneração e carboxilação da RuBP, ou (2) mudanças na $[CO_2]$ no cloroplasto (HIKOSAKA et al., 2006; YAMORI et al., 2012). Em pesquisas com plantas de tabaco, Yamori et al. (2012) relataram que a taxa de assimilação de CO_2 em $380 \mu mol \cdot mol^{-1}$ e $1500 \mu mol \text{ fótons } m^{-2} s^{-1}$, depende do teor de N da folha e é principalmente determinado pela quantidade de elétrons disponíveis para regeneração da RuBP. De um modo geral, isso ocorre porque a assimilação de N é um forte dreno de produtos fotoquímicos, que em condições atmosféricas atuais de CO_2 , atua como um coletor adicional de elétrons em plantas C3, evitando danos fotoinibitórios (RAINES, 2011). No entanto, neste trabalho, com o aumento da $[CO_2]$, não apenas a quantidade, mas a fonte de N disponível foi determinante da eficiência fotoquímica. A maior relação F_v/F_m foi observada para as plantas tratadas com NH_4^+ , e a menor constatada para as plantas que receberam a fonte nítrica (Tabela 4), que conseqüentemente apresentaram baixos valores de J (Tabela 3). Além disso, a maior eficiência fotoquímica das plantas que receberam a fonte amoniacal, pode ser justificada pelo aumento dos teores de clorofila *a* e *b* verificados para este tratamento sob exposição a alta $[CO_2]$, ao passo que para o controle e a fonte nítrica foi observada redução (Figura 6). Esse aumento no teor de clorofila *a* e *b*, pode ainda, estar relacionado a maior atividade da GDH no sentido de síntese de glutamato (Figura 18A), uma vez este AA é o precursor da síntese de clorofila (FORDE; LEA, 2007).

Neste contexto, o baixo desempenho fotossintético das plantas tratadas com NO_3^- pode ser justificado de três maneiras: (1) mesmo com o aumento da demanda energética pelo CCB devido a exposição a maior $[CO_2]$, a produção de NADPH e ATP pela etapa fotoquímica ainda assim, supera a capacidade bioquímica de utilização desses produtos (RAINES, 2011), que somada a baixa absorção e assimilação de NO_3^- (Figuras 13A; 13B e 15A) pode ocasionar uma super redução dos cloroplastos resultando em danos fotoinibitórios em consequência do aumento do conteúdo de H_2O_2 (Figura 20A); (2) com a diminuição da FR (Figura 7F), essas plantas deixaram de ter uma via adicional para o consumo de produtos fotoquímicos, que é importante para manutenção do equilíbrio redox do cloroplasto (REUMANN; WEBER, 2006) e ainda, (3) pela diminuição do conteúdo de clorofila *a* e *b* (Figura 6) e conseqüentemente redução da eficiência fotoquímica (Tabela 4).

Uma das respostas observadas em situações de super redução celular é a produção de espécies reativas de Oxigênio (ERO) (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008). Neste trabalho constatou-se aumento do conteúdo de peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) nas folhas das plantas que receberam a fonte nítrica (Figura 20A), como consequência da maior atividade da superóxido dismutase (SOD) sob alta $[CO_2]$ (Figura 19A). Essa enzima é acionada quando a capacidade de fotoproteção é excedida (LOVELOCK; OSMOND; JEBB, 1994),

indicado pelo declínio da eficiência fotoquímica verificado pela relação Fv/Fm (Tabela 4). Embora com aumento da [CO₂] tenha sido constatado um aumento para atividade de enzimas destinadas a metabolizar o H₂O₂, como a catalase (CAT) (Figura 21A) e a ascorbato peroxidase (APX) (Figura 22A) nas folhas das plantas tratadas com NO₃⁻, possivelmente este aumento não foi suficiente para preservar a integridade do PSII, o que resultou em incremento do conteúdo malondialdeído (peroxidação lipídica; Figura 23) verificado neste tratamento.

A fotossíntese representa a principal fonte de C nas plantas superiores, e qualquer alteração na assimilação de C, afeta toda a dinâmica metabólica celular. Durante a assimilação de N inorgânico, são necessárias quantidades significativas de C e de ATP e NAD(P)H para direcionar a síntese de AA e outros compostos nitrogenados (NUNES-NESI; FERNIE; STITT, 2010). Neste trabalho, o aumento nos teores de sacarose sob alta [CO₂] estão de acordo com o desempenho fotossintético observado para todas as fontes nitrogenadas (Figura 9).

A maior capacidade fotossintética das plantas que receberam a fonte amoniacal, resultou em maior acúmulo de sacarose neste tratamento (Figura 9). Isto pode ter sido crucial para melhorar a assimilação de NH₄⁺ principalmente nas raízes, uma vez que aumenta a disponibilidade de esqueletos de C. De fato, isso pode ser confirmado pelo aumento da atividade da invertase ácida da parede celular (IAP) (Figura 14C). Esta enzima promove a hidrólise da sacarose no apoplasto, diminuindo o acúmulo deste açúcar nas proximidades da parede celular e aumentando a capacidade de importação por diferença no gradiente de concentração, determinando a força do dreno (KOCH, 2004). A maior disponibilidade de hexoses nas folhas e nas raízes (Figura 10) possibilitou que mais C fosse oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e conseqüentemente uma maior síntese de 2-oxoglutarato (2OG), serviu como substrato para enzima GOGAT que também teve sua atividade aumentada neste tratamento sob 760 μmol.mol⁻¹ (Figura 17).

O aumento do teor de sacarose observado nas raízes das plantas tratadas com NO₃⁻ (Figura 17), também pode estar associado a atividade das enzimas do metabolismo do N neste órgão. Os açúcares, especialmente a sacarose, podem induzir atividade RN em *Arabidopsis*, pelo aumento da expressão de genes *NIA* (nitrito redutase [NADH]) (REDA, 2013). Neste trabalho, a maior atividade da RN nas raízes sob 760 μmol.mol⁻¹, indica que com a diminuição da redução do NO₃⁻ na folha, houve uma maior assimilação deste íon no sistema radicular. O incremento da atividade das enzimas GS (Figura 16B), GOGAT (Figura 17) e GDH (Figura 18B), confirmam um aumento da conversão de NO₃⁻ a AA nas raízes expostas a alta [CO₂]. Esses AA, provavelmente foram transportados para a parte aérea, visto que houve redução do teor de proteínas nas raízes para este tratamento (Figura 11B).

A raiz geralmente é um dreno de AA em plantas C3 que assimilam N preferencialmente nas folhas (FISCHER et al., 1998). O transporte de AA da raiz para a parte aérea pode ter significado uma perda substancial de esqueletos de C neste órgão, que em parte, explicaria a redução do acúmulo de MS observada no sistema radicular nas plantas que receberam a fonte nítrica sob alta [CO₂] (Figura 2B). Além disso, com a redução da A (Figura 7A), os esqueletos de C usados na síntese de AA nas raízes, podem ter sido mobilizados através da hidrólise da sacarose armazenada nos vacúolos, como consequência do aumento da atividade da invertase ácida neste compartimento (IAV) (Figura 14A).

A coordenação da interação entre os metabolismos do C e N sob alta [CO₂] também pode envolver sinais hormonais, embora como visto, a fonte inorgânica de N que está sendo oferecida desempenhe um papel importante, funcionando como um sinal metabólico que afeta diferentes aspectos do desenvolvimento da planta. Compreender como a natureza e a influência da assimilação de NO₃⁻ ou NH₄⁺ coordenam a sinalização molecular das respostas fisiológicas será um desafio para pesquisas futuras, assim como integrar os efeitos de outros fatores ambientais que afetam a aclimação fotossintética ao aumento da [CO₂].

5 CONCLUSÃO

A interação entre os metabolismos do Carbono e Nitrogênio são diferencialmente afetadas em plantas de tabaco fertirrigadas com NO₃⁻ ou NH₄⁺ como fontes exclusivas de N e submetidas ao aumento da [CO₂]. Os dados obtidos através da realização desse trabalho, permitem ainda, inferir que os efeitos da forma inorgânica de N que está sendo absorvida do solo, determinam o desempenho fisiológico em plantas de tabaco diante do aumento da [CO₂] previsto para as próximas décadas.

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 3, p. 258–270, 2007.

ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which Nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, v. 163, n. 2, p. 174–199, 2013.

BAILLY, C.; BOUTEAU, H. E.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes rendus biologies**, v. 331, n. 10, p. 806–14, 2008.

BERGES, 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.

BLOOM, A. J. et al. Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 899–903, 2010.

BLOOM, A. J. et al. CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C₃ but not C₄ plants and slows growth under nitrate in C₃ plants. **Ecology**, v. 93, n. 2, p. 355–367, 2012.

BLOOM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant Nitrogen sources. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 10–16, 2015.

BLOOM, J. A. et al. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. **Nature Climate Change**, v. 4, n. 6, p. 477–480, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 6, p. 567–584, 2002.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: ACADEMIC PRESS (Ed.). . **Methods in enzymology**. 1978. p. 302–310.

CAIRO, P.A.R; OLIVEIRA L.E.M, MESQUITA, A. C. **Análise de Crescimento de Plantas**. 1. ed. Vitória da Conquista: 2008. p. 70.

CAIRO, P. A. R. et al. 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**, (Impr.), v. 33, n. 2, p. 369–376, 2009.

CAMARGO, M. A. B.; MARENCO, R. A. Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 205–212, 2011.

CARLISLE, E. et al. The effects of inorganic Nitrogen form and CO₂ concentration on wheat yield and nutrient accumulation and distribution. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012.

CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. 9. ed. Lavras: 2009. p. 234.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.

CHAMPIGNY, M. L.; FOYER, C. Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis: basis for a new concept. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 7–12, 1992.

CRAWFORD, N. M.; FORDE, B. G. Molecular and developmental biology of inorganic Nitrogen nutrition. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. e0011, 2002.

DEL POZO, A. et al. Gas exchange acclimation to elevated CO₂ in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to Nitrogen acquisition and partitioning in wheat grown in field chambers. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 371–380, 2007.

DERMODY, O.; LONG, S. P.; DELUCIA, E. H. How does elevated CO₂ or ozone affect the leaf-area index of soybean when applied independently? **New Phytologist**, v. 169, n. 1, p. 145–155, 2006.

DIETZ, K.-J.; MITTLER, R.; NOCTOR, G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1535–9, 2016.

DISCHE, Z. Methods in carbohydrates chemistry. In: R. WHISTLER, M. W. (Ed.). . **Methods in carbohydrates chemistry**. 2. ed. New York: Academic Press, 1962. v.1, p. 478–512.

DÜRING, H. CO₂ assimilation and photorespiration of grapevine leaves: responses to light and drought. **Vitis**, v. 27, n. 19, p. 208, 1988.

FAHRENDORF, T.; BECK, E. Cytosolic and cell-wall-bound acid invertases from leaves of *Urtica dioica* L.: a comparison. **Planta**, v. 180, n. 2, p. 237–44, 1990.

FARQUHAR, G. D.; VON CAEMMERER, S.; BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. **Planta**, v. 149, n. 1, p. 78–90, 1980.

FENG, Z. et al. Constraints to Nitrogen acquisition of terrestrial plants under elevated CO₂. **Global Change Biology**, v. 21, n. 8, p. 3152–3168, 2015.

FERRARIO-MÉRY, S. et al. Modulation of Carbon and Nitrogen metabolism, and of nitrate reductase, in untransformed and transformed *Nicotiana plumbaginifolia* during CO₂ enrichment of plants grown in pots and in hydroponic culture. **Planta**, v. 202, n. 4, p. 510–521, 1997.

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

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

FORDE, B. G.; LEA, P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2339–2358, 2007.

FOYER, C. H.; PARRY, M.; NOCTOR, G. Markers and signals associated with Nitrogen assimilation in higher plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 382, p. 585–593, 2003.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 315–318, 1977.

GLAS, J. et al. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 17077–17103, 2012.

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**, v. 67, n. 6, p. 1198–1203, 1981.

GUO, S. et al. Ammonium nutrition increases photosynthesis rate under water stress at early development stage of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 296, n. 1–2, p. 115–124, 2007.

HACHIYA, T.; SAKAKIBARA, H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, p. erw449, 2016.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1987.

HEDRICH, R. et al. Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply. **Planta**, v. 213, n. 4, p. 594–601, 2001.

HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B. Nitrate assimilation is essential for the synthesis of organic matter. In: **Plant Biochemistry**. 4. ed. San Diego California: Elsevier Academic Press, 2011. p. 273–305.

HIKOSAKA, K. et al. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 291–302, 1 jan. 2006.

HORCHANI, F.; HAJRI, R.; ASCHI-SMITI, S. Effect of ammonium or nitrate nutrition on photosynthesis, growth, and Nitrogen assimilation in tomato plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 173, n. 4, p. 610–617, 2010.

HUANG, W.; HU, H.; ZHANG, S.-B. Photorespiration plays an important role in the regulation of photosynthetic electron flow under fluctuating light in tobacco plants grown under full sunlight. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

HYMUS, G. J.; BAKER, N. R.; LONG, S. P. Growth in elevated CO₂ can both increase and decrease photochemistry and photoinhibition of photosynthesis in a predictable manner. *Dactylis glomerata* grown in two levels of Nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 1204–1211, 2001.

IGAMBERDIEV, A. U. et al. The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 4, p. 427–438, 2001.

JAUREGUI, I. et al. Root and shoot performance of *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated CO₂: A physiologic, metabolic and transcriptomic response. **Journal of Plant Physiology**, v. 189, p. 65–76, 2015.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 1. ed. New York and London: 1940. p. 523.

KANEMOTO, K. et al. Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ is dependent on N partitioning and transpiration in soybean. **Plant Science**, v. 177, n. 5, p. 398–403, 2009.

KANT, S. et al. Partial substitution of NO₃⁻ by NH₄⁺ fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 303–311, 2007.

KANT, S. et al. Improving yield potential in crops under elevated CO₂: Integrating the photosynthetic and Nitrogen utilization efficiencies. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 162, 2012.

KENDALL, P. A. Use of the ninhydrin reaction for quantitative estimation of amino groups in insoluble specimens. **Nature**, v. 197, n. 4874, p. 1305–1306, 1963.

KITAOKA, S. et al. The photosynthetic response of four seral deciduous broad-leaved tree seedlings grown under elevated CO₂ concentrations. **Journal of Agricultural Meteorology**, v. 72, n. 1, p. 43–49, 2016.

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

KOLLIST, H.; NUHKAT, M.; ROELFSEMA, M. R. G. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 44–62, 2014.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: 1997. p. 198.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. p. F4.3.1-F4.3.8.

LONG, S. P. et al. Rising atmospheric Carbon dioxide: Plants FACE the future. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 591–628, 2004.

LOVELOCK, C. E.; OSMOND, C. B.; JEBB, M. Photoinhibition and recovery in tropical plant species: response to disturbance. **Oecologia**, v. 97, n. 3, p. 297–307, 1994.

MADORE, M.; GRODZINSKI, B. Effect of Oxygen concentration on ¹⁴C Photoassimilate transport from leaves of *Salvia splendens* L. **Plant Physiology**, v. 76, n. 3, p. 782–786, 1984.

MASLE, J. The Effects of elevated CO₂ concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1399–1416, 2000.

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

MISRA, J. B. Integrated operation of the photorespiratory cycle and cytosolic metabolism in the modulation of primary Nitrogen assimilation and export of organic N-transport compounds from leaves: A hypothesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 3–4, p. 319–328, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

NORBY, R. J. et al. Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 6, p. 683–714, 1999.

NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant Carbon Nitrogen interactions. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 973–96, 2010.

PATTERSON, K. et al. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. **Plant, cell & Environment**, v. 33, n. 9, p. 1486–501, 2010.

R. FERNÁNDEZ-ESCOBAR. Use and abuse of Nitrogen in olive fertilization. International Symposium on Olive Irrigation and Oil Quality. Anais...**International Society for Horticultural Science - ISHS**, 2011Disponível em: <http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=888_28>. Acesso em: 23 ago. 2015.

RAINES, C. A. Increasing photosynthetic carbon assimilation in C3 plants to improve crop yield: current and future strategies. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 36–42, 2011.

REDA, M. Regulation of nitrate reduction in *Arabidopsis* WT and *hxx1* mutant under C and N metabolites. **Physiologia Plantarum**, v. 149, n. 2, p. 260–272, 2013.

REUMANN, S.; WEBER, A. P. M. Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--others remain. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1763, n. 12, p. 1496–510, 2006.

SHARKEY, T. D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 73, n. 1, p. 147–152, 1988.

SHARKEY, T. D. What gas exchange data can tell us about photosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, v. 39, n. 6, p. 1161–1163, 2016.

SREEHARSHA, R. V.; SEKHAR, K. M.; REDDY, A. R. Delayed flowering is associated with lack of photosynthetic acclimation in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) grown under elevated CO₂. **Plant Science**, v. 231, p. 82–93, 2015.

STIRBET, A. D. et al. Parameter optimisation of fast chlorophyll fluorescence induction model. **Mathematics and Computers in Simulation**, v. 56, n. 4–5, p. 443–450, 2001.

TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intra-chloroplast and extra-chloroplast metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 252–260, 2012.

TAUB, D. R.; WANG, X. Why are Nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO₂? A critical examination of the hypotheses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 11, p. 1365–1374, 2008.

TENG, N. et al. No detectable maternal effects of elevated CO₂ on *Arabidopsis thaliana* Over 15 Generations. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e6035, 2009.

TILLS, A. R.; ALLOWAY, B. J. The effect of ammonium and nitrate Nitrogen sources on copper uptake and amino acid status of cereals. **Plant and Soil**, v. 62, n. 2, p. 279–290, 1981.

TIMM, S. et al. A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell online*, v. 20, n. 10, p. 2848–2859, 2008.

TISSIER, A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? **The Plant Journal**, v. 70, n. 1, p. 51–68, 2012.

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

VOSS, I. et al. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. **Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 713–722, 2013.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971–974, 1967.

WHITNEY, S. M. et al. Improving recombinant Rubisco biogenesis, plant photosynthesis and growth by coexpressing its ancillary RAF1 chaperone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. 3564–3569, 2015.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 195–210, 2002.

WONG, S.-C. Elevated atmospheric partial pressure of CO₂ and plant growth. **Photosynthesis Research**, v. 23, n. 2, p. 171–180, 1990.

YAMORI, W. et al. Rubisco activase is a key regulator of non-steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. **The Plant Journal**, v. 71, n. 6, p. 871–880, 2012.

ZHANG, F.-C. et al. Growth and major nutrient concentrations in *Brassica campestris* supplied with different NH₄⁺/NO₃⁻ Ratios. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 4, p. 455–462, 2007.

ZHU, X.-G.; LONG, S. P.; ORT, D. R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 235–61, 2010.

ZIEGLER, H. Nature of transported substances. In: **Transport in Plants I**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1975. p. 59–100.