



MARÍLIA MÉRCIA LIMA CARVALHO CARNEIRO

**FISIOLOGIA DE PLANTAS JOVENS DE
SERINGUEIRA CULTIVADAS EM
DIFERENTES FONTES NITROGENADAS E SOB
BAIXA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA E
OXIGÊNIO**

LAVRAS – MG

2014

MARÍLIA MÉRCIA LIMA CARVALHO CARNEIRO

**FISIOLOGIA DE PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA
CULTIVADAS EM DIFERENTES FONTES NITROGENADAS E SOB
BAIXA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA E OXIGÊNIO**

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

Orientador

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Carneiro, Marília Mércia Lima Carvalho.

Fisiologia de plantas jovens de seringueira cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas e sob baixa disponibilidade de água e oxigênio / Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro. – Lavras: UFLA, 2014.

108p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. Seringueira. 2. Nitrogênio. 3. Estresse hídrico. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Ácido aminobutírico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.95041

MARÍLIA MÉRCIA LIMA CARVALHO CARNEIRO

**FISIOLOGIA DE PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA
CULTIVADAS EM DIFERENTES FONTES NITROGENADAS E SOB
BAIXA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA E OXIGÊNIO**

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

APROVADA em 04/04/2014

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA

Dra. Ângela Maria Soares - UFLA

Dr. André Rodrigues dos Reis - UFLA

Dr. Nelson Delú Filho - UNIS

Dra. Liliane Santos de Camargos - UNESP

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

Orientador

LAVRAS – MG

2014

À minha família,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por tudo!
- À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de desenvolver o doutorado.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.
- Ao Professor Luiz Edson Mota de Oliveira pela orientação, amizade, bom humor e por despertar em nós o interesse pelo fantástico mundo da “metabolic networking”.
- À banca examinadora por toda contribuição científica.
- Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal por todos os ensinamentos, em especial à Professora Ângela Maria Soares por toda colaboração científica, paciência, boa vontade, amizade e por todas as conversas que muito me enriqueceram pessoal e profissionalmente.
- Aos funcionários do Departamento, Joel, Odorêncio, Tanham, Lena, Dani e Evaristinho, por todo apoio e por estarem sempre bem dispostos a ajudar...sou muito grata a todos vocês!
- Aos colegas da Fisiologia Vegetal, por todos os momentos compartilhados! Em especial, ao quarteto fantástico (Marcelo, Marília, Fernanda e eu) , e também a Nádia e Helbert pela parceria e boa vontade no momento mais tenso vivido nesse doutorado! Muito obrigada!
- Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, por toda colaboração.
- A André Rodrigues dos Reis, do Departamento dos Solos, pela realização da quantificação dos aminoácidos.
- À Andrea Carla Dalmolin, da Universidade Federal do Mato Grosso, pela gentileza e boa vontade na construção de alguns gráficos.
- Às “Seringuetes” e “ex Seringuetes” (Pollyanna Carvalho, Débora Domiciano, Andiará, Patrícia Lage, Ana Elisa e Karina Lima), pelos bons momentos.
- A Camila Fante, por me receber tão bem, nessa cidade, e dividir comigo momentos de companheirismo e amizade; e a Marília Carvalho também pela amizade e por todo nosso período de convivência! Muito obrigada sempre!
- A Larissa Lima e sua maravilhosa família, por toda atenção e carinho dedicados a mim! Muito obrigada!
- Aos meus colegas do coral por me receberem de braços abertos, com muito bom humor, compartilhando comigo momentos de leveza, música e muita felicidade...momentos únicos vividos aqui!

- A Lúcia, e a toda a equipe do Núcleo Gaia, por fazer de mim uma pessoa mais feliz! Vocês foram muito importantes nessa fase da minha vida!

E aos essenciais...

- Ao meu amigo, querido, irmão, companheiro, Marcelo Pedrosa Gomes, por nunca me abandonar! Amizade verdadeira que distância nenhuma separa! Te agradeço por tudo, mas, principalmente, pelos momentos únicos e inesquecíveis vividos contigo! Sorrisos, lágrimas, festas, trabalhos, artigos, desabafos, desespero, músicas respondendo tudo...enfim, são coisas da vida, que só nós sabemos! Te amo!

- À galera do “Vai dar certo! ”: Ana, Ane Marcela, Kamila Dázio, Jullyanna Carvalho, Jean Marcel, e, principalmente, Hugo Bentzen e Michele Reis. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho! Obrigada pelo esforço, por todo o tempo dedicado a mim e por todos os momentos de alegria, e alguns de desespero, vividos com vocês! Peço desculpas por todo incômodo que causei. Serei sempre grata!

- Ao meu porto seguro, minha base, minha família, por, mesmo distantes, estarem tão presentes e participarem de todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, Adalécio e Consuelo, por me ensinarem os princípios básicos da educação, que levarei sempre comigo, e por todo amor dedicado a mim! E aos meus irmãos, Bárbara e Luan, pedaços de mim, amigos de todas as horas e mais um pouco. Obrigada por compartilharem comigo cada segundo dessa experiência. Essa conquista também pertence a vocês!

- À minha tia Rosana Fialho (Titia Zana), principal responsável por eu estar aqui. Tia, amiga, segunda mãe, pessoa que me ensinou a ir mais longe; e aos seus filhos, meus pequenos príncipes: Luigi e Vinícius, por todos os dias que me alegram!

- À minha prima, Arythuza Dourado, por me “suportar” nos meus piores momentos e em todos os outros também! Obrigada por tudo!

- Aos amigos de sempre, aos novos e a todos que, de alguma forma, torceram e emitiram pensamentos positivos, para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa!

Muito obrigada!

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

(John Ruskin)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e ausência de N nas trocas gasosas, na fotorrespiração, nas enzimas do metabolismo do nitrogênio e antioxidativo e na quantificação de aminoácidos encontrados na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira cultivadas em condições normais (sem estresse) e sob diferentes condições de disponibilidade de água e de oxigênio no substrato. Dois experimentos foram instalados. No primeiro, as plantas foram cultivadas com N na concentração de 8mM, nas seguintes proporções $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0, 0/8 e 0/0 em solução nutritiva de Bolle-Jones. Após sete meses de cultivo nessas condições, avaliações de variáveis associadas ao processo fotossintético (trocas gasosas, fotorrespiração, fluorescência da clorofila a e curva A/Cc) e a quantificação das enzimas SOD, CAT e APX foram realizadas. No segundo experimento, para simulação da baixa disponibilidade de água (BDA) e de oxigênio (BDO) no substrato, foram estabelecidos os seguintes tratamentos: plantas cultivadas na presença de NO_3^- irrigadas à 10% e 100% da capacidade de campo (CC) e alagadas, através da submersão das raízes, com uma lâmina d'água de 4cm acima da superfície da areia; plantas cultivadas na presença NH_4^+ irrigadas à 10% e 100% da CC e alagadas; e plantas cultivadas na ausência de N irrigadas à 10% e 100% da CC e alagadas. Após 7, 14 e 21 dias da indução dos tratamentos, foram feitas as medidas de trocas gasosas, e a quantificação da atividade das enzimas GS/NADH-GOGAT/GDH e SOD/CAT/APX em folha e raiz, bem como a quantificação de aminoácidos presentes na seiva do xilema. Os resultados mostraram que o cultivo das plantas na presença de N foi efetivo em aumentar os processos de defesa contra a fotoinibição, o que pode atenuar o estresse oxidativo oriundo do excesso de energia. O cultivo com NH_4^+ favoreceu o processo fotorrespiratório em plantas de seringueira, acarretando em diminuição das taxas de assimilação de carbono quando comparadas às cultivadas com NO_3^- . Além disso, no segundo experimento, os parâmetros de trocas gasosas (*A*, *gs* e *E*) foram fortemente diminuídos a partir do segundo dia de avaliação nas plantas sob déficit hídrico. As atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT nas folhas também foram diminuídas nesse período, exatamente quando se observa o aumento da produção de GABA nas plantas sob estresse, principalmente naquelas cultivadas na presença de NH_4^+ e ausência de N sob deficiência de O_2 e no último período avaliado (21 dias), em todas as plantas sob déficit hídrico. O acúmulo do GABA ocorreu nas condições dos estresses hídrico e gasoso severos em plantas jovens de seringueira.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*, metabolismo do nitrogênio, fotorrespiração, enzimas antioxidantes, GABA, estresse hídrico.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) and N absence in gas exchange, in the photorespiration, in the enzymes of nitrogen and antioxidant metabolisms and quantification of amino acids found in the xylem sap of young rubber plants grown under normal conditions (no stress) and under different conditions of availability of water and oxygen in the substrate. Two experiments were conducted. In the first one, the plants were grown with N at 8 mM concentration, in the following proportions $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0, 0/8 and 0/0 in nutrient solution Bolle-Jones. After seven months, reviews of variables associated with the photosynthetic process (gas exchange, photorespiration, chlorophyll a fluorescence and curve A/Cc) and quantified of SOD, CAT and APX enzymes were performed. In the second experiment, for simulation of low water availability (LWA) and low oxygen availability (LOA) on the substrate, the following treatments were established: plants grown in the presence of NO_3^- irrigated to 10% and 100% of available water capacity in the substrate, and flooded by submerging the roots with a depth of 4cm water above the surface of the sand; grown in the presence of NH_4^+ irrigated at 10% and 100% of available water capacity in the substrate and flooded plants, and plants grown in the absence of N irrigated at 10% and 100% of available water capacity in the substrate and flooded. After 7, 14 and 21 days of treatment induction, gas exchange measurements, and quantified the activity of GS/NADH-GOGAT/ GDH and SOD/CAT/APX enzymes in leaf and root were made, as well as quantification of amino acids in the xylem sap. The results showed that the cultivation of plants in the presence of N was effective in increasing the processes of defense against photoinhibition, which may attenuate oxidative stress originating from the excess energy. Farming with NH_4^+ favored photorespiration rubber plants, resulting in decreased rates of carbon assimilation when compared to those grown with NO_3^- . Moreover, in the second experiment, gas exchange parameters (A, gs and E) were strongly decreased from the second day of evaluation in plants under water deficit and the activities of antioxidant enzymes (SOD and CAT) in leaves were also decreased in this period, just as we observe the increased production of GABA in these plants under stress, especially those grown in the presence of NH_4^+ and absence of N under O_2 deficiency and at the last evaluation period (21 days) in all plants under water deficit. The accumulation of GABA occurred in conditions of severe water and gaseous stress in young rubber plants.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, nitrogen metabolism, photorespiration, antioxidant enzymes, GABA, water stress.

LISTA DE SIGLAS

α	Inclinação inicial da cinética rápida da fluorescência
α -KG	α -cetoglutarato
<i>A</i>	Taxa de assimilação líquida de CO ₂
AA	Aminoácidos
<i>Ac</i>	Limitações impostas pela atividade da Rubisco
<i>Aj</i>	Limitações impostas pela taxa de transporte de elétrons
ALA	Alanina
AG	Asparaginase
<i>Ap</i>	Limitações impostas pela utilização das trioses fosfato
APX	Ascorbato peroxidase
ARG	Arginina
ASX	Asparagina + Aspartato
AT	Aminotransferases
ATP	Adenosina Trifostato
A/Cc	Curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO ₂ no sítio de carboxilação
BDA	Baixa disponibilidade de água
BDO	Baixa disponibilidade de oxigênio
C	Carbono
Ca	Concentração inicial de CO ₂ na câmara
CAT	Catalase
Cc	Concentração interna de CO ₂ no cloroplasto
CC	Capacidade de campo
Ci	Concentração intercelular de CO ₂
CO ₂	Dióxido de carbono
CRF	Cinética rápida da fluorescência
DFFFA	Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos
DTT	Ditiotreitol
<i>E</i>	Taxa Transpiratória
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ETR	Taxa de transporte de elétrons
ETR _{max}	Taxa máxima de transporte de elétrons
FR	Fotorrespiração
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
Fv/Fm	Eficiência fotoquímica potencial do FSII
GABA	Ácido γ - aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilase

GDH	Glutamato desidrogenase
GHA	Quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato
GLU	Glutamato
GLX	Glutamina + Glutamato
Gm	Condutância mesofílica
GOGAT	Glutamato Sintase
GS	Glutamina Sintetase
G_s	Condutância Estomática
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
I _k	Irradiância mínima de saturação
J	Taxa de transporte elétrons
J _{max}	Velocidade máxima de transporte de elétrons
K _c	Constante cinética da reação de carboxilação da Rubisco
K _o	Constante cinética da reação de oxigenação da Rubisco
N	Nitrogênio
NAD ⁺	Dinucleótideo de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótideo de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP ⁺	Dinucleótideo de nicotinamida e adenina fosfato (forma oxidada)
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NH ₄ ⁺	Amônio
NO	Óxido nítrico
NO ₃ ⁻	Nitrato
NPQ	Coefficiente de extinção não fotoquímico
O	Pressão parcial de O ₂ no cloroplasto
O ₂	Oxigênio
¹ O ₂	Oxigênio singleto
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
OPA	orto-ftaldialdeído
POX	Peroxidase
PVPP	Polivilpolipirrolidona
R	Respiração mitocondrial
R _c	Taxa de respiração mitocondrial na luz
Rd	Respiração medida no escuro
RN	Redutase do Nitrato
RNi	Redutase do Nitrito
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
Q _p	Coefficiente de extinção fotoquímico

qP_{1116}	Coefficiente de extinção fotoquímico à 1116 μmol fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$
SER	Serina
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
<i>TPU</i>	Utilização da triose fosfato
UFLA	Universidade Federal de Lavras
$V_{c_{\max}}$	Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco
$V_{o_{\max}}$	Velocidade máxima de oxigenação
v_0	Taxa de oxigenação da Rubisco
Φ	Relação entre as taxas de carboxilação e oxigenação da Rubisco
Γ^*	Ponto de compensação fotorrespiratório

LISTADE FIGURAS

- Figura 1 O amônio (NH_4^+) pode ser originado da absorção direta, da redução do nitrato, da fotorrespiração, da fixação biológica do N_2 , da quebra da ureia e por meio da atividade da asparaginase. A assimilação se dá pela via GS/GOGAT e pela rota alternativa através da GDH. Abreviaturas: RN-Redutase do Nitrato; RNi-Redutase do Nitrito; GS- Glutamina Sintetase; GOGAT- Glutamato sintase; GDH- Glutamato desidrogenase; AT- Aminotransferases; AA- Aminoácidos; FR- Fotorrespiração; AG- Asparaginase; α -KG- α -cetoglutarato (Autoria: Professor Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA). 24

CAPÍTULO I

- Figura 1 Taxa assimilatória líquida de CO_2 (A), condutância estomática (gs), taxa transpiratória (E) e concentração intracelular de CO_2 (Ci) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições. Médias seguidas por letras diferentes representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Scott-Knott. 53
- Figura 2 Taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições. 54
- Figura 3 Taxa fotossintética (A) em função da concentração interna de CO_2 no cloroplasto (Cc) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato e amônio. 56
- Figura 4 Fotorrespiração em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições. Medias seguidas por letras diferentes representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Scott-Knott. 57
- Figura 5 Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições. Medias seguidas por letras diferentes

representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Scott-Knott.....58

CAPÍTULO II

- Figura 1 Taxa assimilatória líquida de CO_2 (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representas média \pm desvio padrão de quatro repetições 81
- Figura 2 Condutância estomática (gs) (A) e taxa transpiratória (E) (B) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representas média \pm desvio padrão de quatro repetições 82
- Figura 3 Atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) (A) e glutamato desidrogenase (GDH) (B) em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representas média \pm desvio padrão de quatro repetições 83
- Figura 4 Atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) (A), glutamato sintase (NADH-GOGAT) (B) e glutamato desidrogenase (GDH) (C) em raízes de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representas média \pm desvio padrão de quatro repetições 84
- Figura 5 Teor de nitrato na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após

- a indução do estresse. Barras representas média \pm desvio padrão de quatro repetições 85
- Figura 6 Ácido γ -aminobutírico (GABA) translocado na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse..... 86
- Figura 7 Asparagina + Aspartato (ASX) e Glutamina + Glutamato (GLX) translocados na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse..... 87
- Figura 8 Alanina, Arginina e Serina translocados na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse..... 88
- Figura 9 Somatório dos outros aminoácidos translocados na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Outros incluem: Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano, Tirosina e Valina..... 89
- Figura 10 Atividades das enzimas antioxidantes SOD (A) e CAT (B) em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representas média \pm desvio padrão de quatro repetições 91

Figura 11 Atividades das enzimas antioxidantes, SOD (A) e CAT (B) em raízes de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representas média \pm desvio padrão de quatro repetições92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Importância da cultura da Seringueira	21
2.2 Metabolismo do Nitrogênio em Seringueira	23
2.3 Metabolismo do Nitrogênio sob condições de baixa disponibilidade de água e de oxigênio	28
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 1	43
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Características avaliadas.....	48
2.1.1. Avaliações fotossintéticas	48
2.1.2. Curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO₂ no sítio de carboxilação (A/Cc).....	50
2.1.3. Avaliações bioquímicas.....	51
2.1.3.1. Enzimas do Metabolismo Antioxidante	51
2.2. Delineamento Experimental.....	52
3 RESULTADOS	52
3.1. Fotossíntese e fotorrespiração.....	52
3.2. Enzimas do Metabolismo Antioxidante	57
4 DISCUSSÃO	59
5 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO 2	67
1 INTRODUÇÃO.....	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	72

2.1. Características avaliadas.....	76
2.1.1. Trocas Gasosas.....	76
2.1.2. Análises Bioquímicas.....	76
2.1.3. Quantificação de Nitrato e Aminoácidos na seiva do xilema.....	78
2.2. Delineamento experimental e análise estatística.....	79
3 RESULTADOS.....	80
3.1. Trocas Gasosas.....	80
3.2. Enzimas do Metabolismo do Nitrogênio.....	83
3.3. Nitrato na seiva do xilema.....	85
3.4. Aminoácidos translocados na seiva do xilema.....	86
3.5. Enzimas do Metabolismo Antioxidante.....	90
4 DISCUSSÃO.....	93
5 CONCLUSÃO.....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* [(Willd. ex. A.Dr. Jussieu.) Muell. Arg.]), nativa da região Amazônica, é a única espécie explorada comercialmente, que produz quantidades de látex de alta qualidade viáveis para a produção de borracha natural (30-50 % do volume de látex fresco) (KO; CHOW; HAN, 2003). Essa matéria-prima é utilizada para diversas finalidades, desde a produção de pneumáticos a materiais médico-hospitalares (ROSADO; PIRES; SANTOS, 2006).

Apesar de o Brasil ser o centro de origem da seringueira, o país saiu da posição de exportador para importador há mais de uma década (GONÇALVES, 2002; INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP, 2013). Nessa condição, é de grande relevância o empenho das comunidades científicas e produtoras para a expansão das áreas de cultivo com essa espécie no país. Para isso, é imprescindível o desenvolvimento de novas tecnologias e mais estudos que envolvam os principais aspectos fisiológicos e metabólicos, visando gerar conhecimento que pode vir a contribuir para maior produtividade.

A assimilação do nitrogênio (N) é um dos fatores interessantes a ser considerado diante da sua significância no metabolismo vegetal (PALLARDY, 2008; LI; WANG; STEWAR, 2013) e da carência de informações básicas envolvidas na assimilação e transporte de nitrogênio e carbono (C), nessa espécie. As diferentes formas de N (amônio - NH_4^+ e nitrato - NO_3^-) afetam algumas características morfológicas e fisiológicas nas plantas, a exemplo de crescimento de raízes, taxas fotossintéticas, condutância do mesófilo, conteúdo de N total e aminoácidos livres, bem como a quantidade de açúcares. Além desses fatores, alteram a absorção de íons minerais, o acúmulo de nutrientes nas plantas e produzem efeitos diferentes sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os níveis de enzimas antioxidantes (LI; WANG; STEWAR, 2013).

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura sobre a dinâmica do N em plantas de seringueira. No Brasil, existem alguns estudos relacionando o metabolismo do nitrogênio aos eventos fisiológicos que ocorrem nessa espécie (ALVES, 2001; COSTA NETO, 1997; DELÚ-FILHO et al., 1998; LEMOS, 1999; SHAN et al., 2012; CARVALHO, 2012). Entretanto, ainda precisa ser estudada a influência das diferentes fontes de N nas respostas de plantas de seringueira cultivadas em condições normais e, também, sob condições adversas de ambiente, visando conhecer o comportamento dessa espécie, principalmente no cenário atual de mudanças climáticas.

Diante do exposto, neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito do NO_3^- , NH_4^+ e ausência de N nas trocas gasosas, no funcionamento do processo fotorrespiratório, nas enzimas do metabolismo do nitrogênio e antioxidativo e nas formas de N transportados na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira, cultivadas em condições normais (sem estresse) e sob diferentes condições de disponibilidade de água e de oxigênio (O_2) no substrato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura da Seringueira

A seringueira pertence à família Euphorbiaceae, e sua área de ocorrência natural abrange a Amazônia brasileira e grande parte dos países da América do Sul. O gênero *Hevea*, compreende onze espécies, sendo a *Hevea brasiliensis* a única cultivada e explorada comercialmente, em razão da sua capacidade produtiva e qualidade de látex superior às demais (SECCO, 2008).

Essa espécie é também considerada “sequestradora” de carbono, contribuindo para amenizar o “efeito estufa” (JACOVINE et al., 2006) e produz matéria-prima agrícola essencial à fabricação de uma ampla variedade de produtos industriais (automobilística, materiais médico-hospitalares, calçados, tintas e vernizes, etc.). Além disso, a heveicultura tem importância socioeconômica, por meio da geração de empregos, aumento da renda familiar, fixação do homem no campo, bem como desenvolvimento econômico local e regional (NASCIMENTO, 2010).

Apesar da disponibilidade de produtos sintéticos à base de petróleo, a borracha natural é altamente valorizada por não ter um substituto sintético comparável à sua elasticidade, resiliência e resistência a altas temperaturas (HAN et al., 2000). Caso a demanda continue crescendo com a atual taxa, estima-se que o mundo enfrentará um déficit na oferta de borracha natural de um milhão de toneladas em 2020 (COSTA et al., 2008).

Atualmente, os maiores produtores mundiais de borracha natural são Tailândia, Indonésia, Malásia, Índia e Vietnã, que juntos são responsáveis por cerca de 80 % da produção (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013). O Brasil é o oitavo maior produtor mundial e dentre os estados brasileiros, São Paulo, Mato Grosso, Bahia e Espírito Santo

são os responsáveis pela maior parcela dessa produção (INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP, 2013).

O Brasil passou de principal produtor e exportador mundial, no início do século XX, a importador dessa matéria-prima (BERNARDES; VEIGA; FONSECA FILHO, 2000). Atualmente, o país consome 320 mil toneladas de borracha por ano e produz apenas 130 mil toneladas, tendo que importar o restante (MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013). Sua contribuição na produção mundial fica em torno de 1% (INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP, 2013). Dessa forma, a expansão da heveicultura seria uma alternativa para tentar minimizar esse déficit, buscando a autossuficiência e voltando a ocupar uma posição de relevância na produção mundial.

As regiões tradicionais de cultivo da seringueira no Brasil são a Amazônia Tropical Úmida, Mato Grosso e Bahia. As áreas de escape, aquelas desfavoráveis ao desenvolvimento do fungo causador do mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*), estão localizadas nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país, onde a seringueira encontrou condições edafoclimáticas adequadas e mão de obra especializada, além do maior volume de capital para investimento (ROSSMANN; GAMEIRO; PEREZ, 2006). O estado de Minas Gerais apresenta uma grande área climaticamente favorável ao desenvolvimento dessa cultura (CAMARGO; MARIN; CAMARGO, 2003) e, atualmente, extrai 4,5 mil toneladas de borracha natural por ano. A região do Triângulo Mineiro se destaca com a maior produção do Estado, em torno de 77% (SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS, 2013).

Apesar do cultivo da seringueira para a extração da borracha ser um negócio altamente rentável, um aspecto que se destaca envolvendo essa espécie é a carência de investigações e de pesquisadores dedicados às pesquisas com essa

espécie, o que não ocorre com as principais culturas do agronegócio mundial. Portanto, mais estudos acerca dos principais aspectos fisiológicos e metabólicos, relacionados à cultura em diferentes condições de ambiente são fundamentais, visando aumentar o conhecimento sobre o comportamento dessa espécie e, posteriormente, poder contribuir para a maximização da sua produtividade.

2.2 Metabolismo do Nitrogênio em Seringueira

Considerado um elemento essencial às plantas, o nitrogênio é necessário para a síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, clorofilas, ácidos nucleicos, coenzimas, além de fitohormônios, vitaminas e alcalóides que desempenham importantes papéis no metabolismo vegetal. A deficiência desse elemento é, após o estresse hídrico, a limitação mais comum para o desenvolvimento do vegetal (MILLER; CRAMER, 2005; PALLARDY, 2008; LI; WANG; STEWAR, 2013).

As principais formas minerais de absorção de N pelas plantas são: amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) (LI; WANG; STEWAR, 2013), sendo que a forma nítrica é a mais abundante em solos cultivados, em consequência do processo de nitrificação por bactérias que provocam a oxidação do amônio livre. Porém, dependendo das condições do solo, a forma amoniacal pode ser a mais abundante pela inibição desses organismos. Em geral, plantas adaptadas a baixo pH, baixa temperatura, solos anaeróbicos e o acúmulo de compostos fenólicos alelopáticos no solo que inibem o processo de nitrificação, são as que promovem o acúmulo de NH_4^+ e, conseqüentemente, sua maior absorção. Já, em condições de pH elevado e solos aeróbicos, o NO_3^- é a forma predominante (MILLER; CRAMER, 2005).

O NO_3^- não pode ser diretamente assimilado pelas plantas até ser reduzido a amônio, o intermediário central do metabolismo do N (Fig. 1). Essa redução é catalisada por enzimas em duas etapas: a primeira ocorre no citosol através da enzima redutase do nitrato (RN) que transforma NO_3^- em nitrito (NO_2^-), e a

segunda ocorre nos cloroplastos (parte aérea) e plastídios (raízes), através da redutase do nitrito (RNi) que converte NO_2^- a NH_4^+ (LI; WANG; STEWAR, 2013). O NH_4^+ produzido é, então, assimilado pelas enzimas glutamina sintetase (GS), que requer ATP na reação para adicionar NH_4^+ ao glutamato (GLU), formando glutamina (GLN), e glutamato 2-oxoglutarato aminotransferase ou glutamato sintase (GOGAT) que transfere o N amídico da glutamina ao α -cetoglutarato para formar duas moléculas de glutamato (LEA; MIFLIN, 2011). Ou, ainda, pela enzima Glutamato Desidrogenase (GDH) que participa de uma rota alternativa, realizando a catálise reversível da aminação do glutamato, apesar desta ser mais efetiva no sentido de desaminação (TERCE-LAFORGUE et al., 2013; LEA; MIFLIN, 2011). Atualmente, já se sabe que essa enzima desempenha um papel insignificante na assimilação de amônio (FONTAINE et al., 2012).

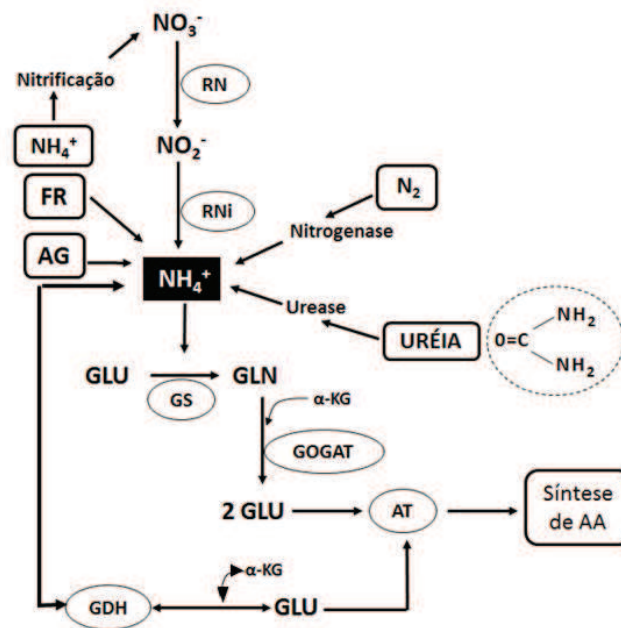


Figura 1 O amônio (NH_4^+) pode ser originado da absorção direta, da redução do nitrato, da fotorrespiração, da fixação biológica do N_2 , da quebra da ureia e por meio da atividade da asparaginase. A assimilação se dá pela via GS/GOGAT e pela rota alternativa, através

da GDH. Abreviaturas: RN-Redutase do Nitrato; RNi-Redutase do Nitrito; GS- Glutamina Sintetase; GOGAT- Glutamato sintase; GDH- Glutamato desidrogenase; AT- Aminotransferases; AA- Aminoácidos; FR- Fotorrespiração; AG- Asparaginase; α -KG- α -cetoglutarato (Autoria: Professor Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA).

Depois da absorção pelas plantas, compostos nitrogenados orgânicos simples, tais como os aminoácidos, podem ser rapidamente assimilados e transformados em outros aminoácidos por transaminação e desaminação (LI et al., 2013) e, em seguida, em proteínas ou convertidos nos correspondentes cetoácidos que podem fornecer esqueletos de carbono para os metabolismos do N e do C (WANG et al., 2003).

Os aminoácidos formados nas raízes são exportados para a parte aérea através do xilema, por isso a análise dos aminoácidos translocados na seiva dá uma imagem bastante confiável do transporte de N em plantas (FISCHER et al., 1998; OH; KATO; XU, 2008). Em seringueira, Alves (2001) mostrou que o padrão de translocação de aminoácidos no xilema de plantas jovens é semelhante à maioria das espécies arbóreas, predominando a glutamina e a arginina, independente da fonte de N utilizada. Já, Diniz (2011), estudando bactérias diazotróficas associadas a plantas jovens de seringueira e sua influência sobre o metabolismo do nitrogênio encontrou glutamina, ácido γ - aminobutírico (GABA), aspartato, arginina, glutamato, alanina e serina como os principais aminoácidos transportados nas plantas controle, suplementadas com 8mM de N (5mM NO_3^- / 3mM NH_4^+).

A seringueira apresenta uma questão peculiar quanto ao metabolismo do N, pois até o momento, através das metodologias utilizadas, *in vivo* e *in vitro*, (COSTA NETO, 1997; DELÚ-FILHO; OLIVEIRA; ALVES, 1997; LEMOS et al., 1999; ALVES, 2001; SHAN et al., 2012) não foi detectada a atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas, mas apenas no sistema radicular e no caule de plantas jovens (DELÚ FILHO et al., 1998; SHAN et al., 2012; CARVALHO,

2012), provavelmente, em decorrência da presença de inibidores ou por compostos presentes no látex.

Apesar dessa peculiaridade, já foi encontrada na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira, NO_3^- e pequenas concentrações de NH_4^+ sendo translocados (ALVES, 2001; DINIZ, 2011; CARVALHO, 2012). Além disso, adicionando NO_3^- ao meio de cultivo, ocorre aumento da atividade da GS, maior nas folhas que nas raízes, e uma alta correlação entre a atividade da GS e da RN nas raízes, sugerindo que a GS radicular depende do amônio produzido na própria raiz, após a redução pela RN. Como não tem sido conhecida a atividade da RN nas folhas, os altos valores da atividade da GS, nesse órgão, sugerem a presença de outras fontes de amônio, como o liberado durante a fotorrespiração (WALLSGROVE et al., 1983; DELÚ-FILHO; OLIVEIRA; ALVES, 1997; LEMOS, 1999) e/ou através de outras reações (Fig.1).

A fotorrespiração, também chamada de ciclo C_2 , é o processo na qual a Rubisco (Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) atua como oxigenase, catalisando a reação do oxigênio à ribulose-1,5-bifosfato, gerando uma molécula de 3-fosfoglicerato e outra de 2-fosfoglicolato. Essa via metabólica ocorre em três organelas: cloroplastos, peroxissomos, e nas mitocôndrias, onde a glicina é convertida em serina, ocorrendo a liberação de uma molécula de CO_2 e outra de NH_4^+ (WINGLER et al., 2000), importante ponto de ligação entre os ciclos do C e N. Em seringueira, o processo fotorrespiratório parece ter grande relevância, por isso, precisa ser melhor estudado.

Com o avanço dos recursos técnicos dos analisadores portáteis de CO_2 , tornou-se possível a avaliação da fotorrespiração, 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). Além disso, por meio das medidas de trocas gasosas, também é possível construir curvas da taxa de

assimilação líquida de CO_2 (A), em função da concentração intercelular de CO_2 (C_i) em plantas que apresentem metabolismo C_3 . Essa curva (A/C_i) auxilia no cálculo das variáveis da Rubisco e da atividade fotoquímica (BERNACCHI et al., 2001), o que permite explorar com mais detalhes o nível fotossintético da folha, fornecendo dados de parâmetros muito importantes relacionados à fisiologia foliar (SHARKEY et al., 2007; PIMENTEL et al., 2011).

Para a elaboração da curva de saturação do CO_2 ou curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO_2 no sítio de carboxilação (A/C_c), utiliza-se o modelo bioquímico desenvolvido por Farquhar, Von Caemmerer e Berry (1980), modificado por Sharkey et al. (2007). As respostas fotossintéticas das plantas para variações das concentrações de carbono nos permite inferir sobre diferentes parâmetros da fisiologia da folha (SHARKEY et al., 2007) como a velocidade máxima de carboxilação da rubisco ($V_{c_{\max}}$), velocidade máxima de oxigenação ($V_{o_{\max}}$), velocidade máxima de transporte de elétrons (J_{\max}), respiração mitocondrial (R) e condutância mesofílica (g_m).

A fluorescência da clorofila a é outra técnica comumente utilizada na fisiologia vegetal e avalia a atividade do fotossistema II (FSII). Esse é um método não invasivo, confiável, rápido e facilmente mensurável, que fornece informações básicas sobre o estado do aparato fotossintético (THOREN et al., 2010), considerando aspectos funcionais e estruturais. Além disso, também é um indicador mais amplo das respostas das plantas às mudanças ambientais (MURCHIE; LAWSON, 2013). A combinação dessa técnica com a avaliação das trocas gasosas, possibilita a compreensão do metabolismo fotossintético, associando às reações fotoquímicas e bioquímicas da fotossíntese (MARTINAZZO, 2011). Em seringueira, estudos de fluorescência da clorofila, relacionando fontes nitrogenadas são inexistentes, portanto, ainda necessários.

Durante o processo fotossintético, ocorrem, simultaneamente, respiração e fotorrespiração. Ambos os eventos são, dentre outros, fontes de produção de

espécies reativas de oxigênio (EROs) (DU et al., 2001). As EROs desempenham um papel importante na destruição das membranas lipídicas das células, proteínas, ácidos nucléicos e outras macromoléculas (KE; SUN; WANG, 2003). Podem ser produzidas em condições normais, quando o metabolismo da planta está em equilíbrio dinâmico, ou sob condições de estresse onde ocorre maior produção dessas EROs, e, nesse caso, as plantas necessitam de um sistema de defesa antioxidante eficiente para evitar maiores danos ao vegetal. Os sistemas de enzimas antioxidantes também são afetados pelas diferentes fontes de N (NH_4^+ e NO_3^-) (ZHANG et al., 2006) e influenciam de forma diferenciada no balanço entre a formação e a limpeza das EROs nas células (CAO; LI; ZHANG, 2003).

Diante do exposto, pôde-se verificar a influência do nitrogênio na fisiologia do vegetal, e quando se trata de seringueira, muitas questões ainda precisam ser elucidadas e, por isso, a importância de se conhecer a dinâmica do N na avaliação do comportamento fisiológico dessa espécie nos diferentes estádios de desenvolvimento já utilizados no cultivo dessa espécie e também em diferentes condições de ambiente, especialmente quando se considera as condições climáticas estacionais e edáficas das regiões com potencial para o desenvolvimento da heveicultura (LEMOS et al., 1999).

2.3 Metabolismo do Nitrogênio sob condições de baixa disponibilidade de água e de oxigênio

O estresse é caracterizado como um desvio significativo das condições ótimas de desenvolvimento (LARCHER, 2000), em decorrência de fatores bióticos e/ou abióticos que desencadeiam um conjunto de mudanças no corpo do vegetal. Os estresses, hídrico e gasoso, têm profundo impacto sobre os sistemas ecológicos e agrícolas, sendo considerados importantes fatores ambientais que comprometem a fotossíntese e, conseqüentemente, a produtividade das plantas (OUKARROUM et al., 2007; MARTINAZZO et al., 2013).

Diante de cenários de mudanças climáticas que indicam a ocorrência de eventos extremos com maior frequência nos próximos anos e, ainda, a escassez de água doce para abastecimento, causada, principalmente, pelo aumento da população mundial, a seca tem sido o estresse ambiental mais importante que afeta a agricultura em todo o mundo (HU; XIONG, 2014). O déficit hídrico pode prejudicar a produtividade em graus variados, dependendo do tempo de início, duração e intensidade do mesmo. Quando severo, pode resultar na suspensão da fotossíntese, distúrbios do metabolismo e na morte do vegetal (HONG-BO et al., 2008).

O estresse por falta d'água desencadeia uma ampla variedade de respostas na planta, como alterações na expressão gênica e metabolismo celular, diminuições nas taxas de crescimento e produtividade, em decorrências da redução do potencial hídrico das folhas, fechamento estomático e consequente diminuição das trocas gasosas, o que inibe vários processos bioquímicos e fisiológicos, como a fotossíntese, respiração e absorção de íons (HONG-BO et al., 2008). A restrição da concentração interna de CO_2 , em razão do fechamento dos estômatos (QUICK et al., 1992) pode também provocar fotoinibição pela diminuição do uso de elétrons para fotossíntese (ROLAND et al., 2006), dessa forma, o excesso de energia química produzido durante a fase fotoquímica pode ser dissipado através da fotorrespiração, que protege o aparato fotossintético (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011).

A deficiência hídrica também diminui a absorção de nutrientes pela raiz e transporte para a parte aérea, devido à restrição da taxa de transpiração, o que altera o transporte ativo e a permeabilidade da membrana (KRAMER; BOYER, 1995). Em contrapartida, algumas espécies têm desenvolvido mecanismos de tolerância para sobreviver à seca intensa, por meio do acúmulo de osmoprotetores e antioxidantes (HU; XIONG, 2014).

O alagamento dos solos é também um fenômeno comum, resultante, principalmente, de solos compactados ou com deficiência de drenagem natural (BRANDÃO; SODEK, 2009; LANZA; ROSSI; SODEK, 2013) e, juntamente com a salinização dos solos, têm afetado cerca de 80 milhões de hectares das terras mundiais (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE, 2012). Algumas plantas possuem tolerância ao alagamento, e esta depende da intensidade, do tipo de solo e duração do mesmo (LANZA; ROSSI; SODEK, 2013). A seringueira parece apresentar estratégias adaptativas ao alagamento (CARVALHO, 2012), porém, mais estudos são necessários visando a elucidar as possíveis rotas metabólicas envolvidas nesse processo.

O oxigênio (O_2) atmosférico se difunde muito vagarosamente em solos inundados, de forma que sua concentração pode cair para valores muito baixos ou até desaparecer dentro de poucas horas, tornando o solo hipóxico (com baixa concentração de O_2) ou anóxico (privação total do O_2), e embora as raízes sejam capazes de respirar anaerobicamente (fermentação), se essa situação metabólica continuar, ocorrerão distúrbios no metabolismo geral da planta (LARCHER, 2000; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

Quando a respiração aeróbica cessa nas raízes, ocorre queda nos níveis de energia (ATP) e, conseqüentemente, há uma redução na absorção e transporte de íons que demandam a atividade de ATPases, podendo ocasionar uma redução nas trocas gasosas (KOZLOWSKI, 1997; LIAO; LIN, 2001), além de alterações na absorção de macro e micro nutrientes, na partição e translocação de fotoassimilados e na produção de biomassa (PEZESHKI, 2001). Além disso, plantas submetidas à hipoxia tendem a apresentar rotas metabólicas alternativas, como a via fermentativa e a produção de aminoácidos, a partir do piruvato acumulado (MIYASHITA; GOOD, 2008).

A forte interação entre os nutrientes e o *status* hídrico das plantas parece ser fundamental para uma compreensão mais profunda das respostas aos estresses

(MAUREL et al., 2008). Sabe-se que as duas fontes minerais de N (NH_4^+ e NO_3^-) não são absorvidas pelas plantas até chegarem às áreas da superfície da raiz, por meio da interceptação radicular, difusão ou fluxo de massa (BARBER, 1966), e todas essas vias estão direta ou indiretamente relacionadas à água do solo (escassez ou excesso), o que pode, dentre outras alterações, modificar a absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, a fisiologia da planta.

Pesquisas recentes sugerem que o N pode regular a transpiração e o fluxo de massa dos nutrientes, onde o NO_3^- modula a condutância hidráulica das raízes, através do controle das aquaporinas e o óxido nítrico foliar modula a condutância estomática, juntamente com a regulação dos efeitos do pH e fitormônios (CRAMER; HAWKINS; VERBOOM, 2009; MATIMATI; VERBOOM; CRAMER, 2014).

Estudos demonstram também que o nitrato melhora a tolerância de plantas à hipoxia, pois reduz os danos provocados pelo alagamento, embora os mecanismos envolvidos sejam pouco conhecidos (MALAVOLTA, 1954; BRANDÃO; SODEK, 2009; LANZA; ROSSI; SODEK, 2013). Teoricamente, esse processo ocorre uma vez que a redução do nitrato demanda NADH citossólico, promovendo a regeneração do NAD^+ (BRANDÃO; SODEK, 2009). Dados recentes indicam que a redução do nitrito, produto da redução do nitrato, a óxido nítrico (NO) também seja importante na regeneração do NAD^+ , e, apesar dessas alterações metabólicas contribuírem para a tolerância ao alagamento, espécies diferentes mostram grandes variações nesse grau de tolerância (OLIVEIRA; SALGADO; SODEK, 2013).

A hipoxia promove a acidificação do citosol em decorrência ao decréscimo dos níveis de ATP (RICARD et al., 1994), o que inibe a produção das aquaporinas, proteínas de membrana presentes nas células vegetais que facilitam o transporte de água e/ou pequenos solutos ou gases (MAUREL et al., 2008). Esse fato sugere que a baixa disponibilidade de oxigênio inibe a absorção de água pelas

raízes (TOURNAIRE-ROUX et al., 2003). Uma vez inibida a produção de aquaporinas nas raízes, a planta acaba passando por uma situação de déficit hídrico. Além disso, essa regulação ainda pode evitar a diluição excessiva da seiva do xilema, após alagamento ou a longo prazo, favorecer o acúmulo de etileno que, por sua vez, induz a diferenciação de aerênquimas (TOURNAIRE-ROUX et al., 2003; MAUREL et al., 2008).

Medições das trocas gasosas são utilizadas na quantificação dos fluxos de CO₂ e água que ocorrem nas folhas, o que permite um melhor entendimento do mecanismo de abertura e fechamento estomático sob condições adversas de ambiente (ENNAHLI; EARL, 2005). Um sistema deficiente na absorção de água, causado pelo déficit hídrico e pelo alagamento, limita a fixação de CO₂ em decorrência do fechamento dos estômatos, comprometendo a capacidade fotossintética. Dessa maneira, a redução do carbono pelo ciclo de Calvin é diminuída e, conseqüentemente, o NADP⁺, que serve como acceptor de elétrons da fotossíntese. Durante a transferência de elétrons, quando a ferredoxina se encontra super-reduzida, elétrons podem ser transferidos do fotossistema I (FS I) para o oxigênio, o que leva a formação do radical superóxido (O₂^{•-}). Esse processo provoca mais reações na cadeia, gerando mais EROs, causando o estresse oxidativo (PANDA; KHAN, 2009).

Os estresses causados pela seca e pelo alagamento do solo induz o estresse oxidativo em diversas plantas, em que as EROs (radical superóxido [O₂^{•-}], radical hidroxila [OH[•]], peróxido de hidrogênio [H₂O₂] e oxigênio singlete [¹O₂]) são formados. Essas espécies são geradas durante processos metabólicos nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, e parede celular, sendo seu acúmulo potencialmente prejudicial às células da planta (JALEEL et al., 2009). Em condições de estresse severo, pode ocorrer um aumento considerável na produção de EROs, o que pode levar a uma cascata de eventos que se inicia com a

peroxidação de lipídeos, avança para degradação de membranas e morte celular (PANDA; KHAN, 2009).

Como uma estratégia de proteção aos danos oxidativos, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa não-enzimático, composto por carotenóides, ascorbato, glutatona, α -tocoferóis; e enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD; 1.15.1.1)), que catalisa a reação do radical superóxido à H_2O_2 ; catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que produz água (H_2O) e oxigênio (O_2), a partir do H_2O_2 ; e enzimas do ciclo ascorbato-glutaciona, como a ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) que detoxifica o H_2O_2 produzido pela SOD e as peroxidases (POX) (JALEEL et al., 2009).

Sob deficiência de O_2 , a assimilação do NH_4^+ pela via GS/GOGAT torna-se mais ativa. Essa via parece ter um papel importante no acúmulo de aminoácidos livres, especialmente Alanina (ALA) e ácido γ -aminobutírico (GABA), por estar envolvida na síntese de glutamato (GLU). Como o GLU é um precursor comum da formação desses compostos, ele é fundamental no metabolismo de aminoácidos (REGGIANI et al., 2000). Aumentos nos teores de ALA e GABA foram observados em plantas de seringueira sob condições de deficiência de O_2 cultivadas em diferentes fontes de N (CARVALHO et al., 2013).

Em plantas sob déficit hídrico, o acúmulo de aminoácidos livres é um fator significativo e pode ser ocasionado pela hidrólise das proteínas (EL-TAYEB; HASSANEIN, 2000). O aumento de aminoácidos livres nessas condições leva a um ajuste dinâmico do metabolismo do N, o que poderia contribuir para a tolerância da planta sob deficiência hídrica, por meio da diminuição do potencial osmótico ou como uma reserva de nitrogênio, principalmente para a síntese de enzimas específicas (NAVARI-IZZO et al., 1990). Dessa maneira, os danos causados pela baixa disponibilidade de água e de oxigênio podem ser monitorados, a partir da análise da seiva do xilema.

A compreensão dos processos fisiológicos e bioquímicos alterados por determinados tipos de estresses é importante para se entender o comportamento das plantas e os mecanismos envolvidos na tolerância destas. Até o momento, pesquisas sobre o efeito das fontes de N e da baixa disponibilidade hídrica e de oxigênio em plantas jovens de seringueira são escassas, portanto, o estudo da dinâmica do N, bem como a avaliação das enzimas atuantes nesse processo são de grande valia, especialmente quando se deseja avaliar, comparativamente, o desempenho do vegetal em diferentes condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313–39, 2008.
- BARBER, S. A. The role of root intercept, mass flow, diffusion in regulating the uptake of ion by plants from soil. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Limiting steps in ion uptake by plants from soil**. Vienna: IAEA, 1966. p. 39-45.
- BERNACCHI, C. et al. Improved temperature response functions for models of rubisco-limited photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 253-259, Feb. 2001.
- BERNARDES, M. S.; VEIGA, A. S.; FONSECA FILHO, I. I. Mercado brasileiro de borracha natural. In: BERNARDES, M. S. (Ed.). **Sangria da seringueira**. Piracicaba: Editora da Esalq, 2000. P. 365-388.
- BRANDÃO, A. D.; SODEK, L. Nitrate uptake and metabolism by roots of soybean under oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 21, n. 1, p. 13–23, 2009.
- CAMARGO, A. P.; MARIN, F. R.; CAMARGO, M. B. P. **Zoneamento climático da Heveicultura no Brasil**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2003.
- CAO, C. L.; LI, S. X.; ZHANG, Z. P. Effect of N form on the activity of protectase and wheat yield at the vegetative and reproductive growth stage. **Chinese Journal of Soil Science**, China, v. 14, n. 1, p. 294–298, 2003.
- CARVALHO, P. A. et al. Compostos nitrogenados transportados na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira (*Hevea spp*) cultivadas com nitrato e/ou amônio e sob alagamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 14., 2013, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: [s.n], 2013. 1 CD ROM.

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

COSTA NETTO, A. P. **Efeito da presença de nitrogênio exógeno ($N-NO_3^-$ e/ou NH_4^+) sobre a atividade das enzimas de assimilação do amônio e remobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. 1997. 44 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

COSTA, L. C. et al. Mudanças climáticas e seus impactos na cultura da seringueira em Minas Gerais. In: ALVARENGA, A de P.; CARMO, C. A. F. S. do. (Org.). **Seringueira**. Viçosa: Epamig, 2008. p. 53-81.

CRAMER, M. D.; HAWKINS, H.-J.; VERBOOM, G. A. The importance of nutritional regulation of plant water flux. **Oecologia**, Berlin, v. 161, n. 1, p. 15–24, Aug. 2009.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 21, p. 329-336, 1997.

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

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

DU, X. M. et al. Production and scavenging of reactive oxygen species in plants. **Chinese Journal Biotechnology**, China, v. 17, n. 2, p. 121–125, Mar. 2001.

DURING, H. CO_2 assimilation and photorespiration of grapevines leaves: responses to light and drought. **Vitis**, Siebeldingen, v. 27, p. 199-208, 1988.
EL-TAYEB, M. A.; HASSANEIN, A. M. Germination, seedling growth, some organic solutes and peroxidase expression of different vicia faba lines as influenced by water stress. **Acta Agronomica Hungarica**, Budapest, v. 48, p. 11-20, 2000.

ENNAHLI, S.; EARL, H. J. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. **Crop Science**, Madison, v.45, n. 6, p. 2374-2382, Nov. 2005.

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

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

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

GONÇALVES, P. de S. Uma história de sucesso: a seringueira no Estado de São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 54, n. 1, p. 06-14, 2002.

HAN, K.-H. et al. Genes expressed in the latex of *Hevea brasiliensis*. **Tree Physiology**, Durham, v. 20, n. 8, p. 503- 510, Apr. 2000.

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. **Relatório perspectivas do meio ambiente mundial: estado do meio ambiente e retrospectivas políticas: 1972-2002**. Brasília: IBAMA, 2012. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. Production and consumption of natural rubber. **Rubber industry Report**, Singapore, May 2013. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

JACOVINE, L. A. G. et al. A seringueira no contexto das negociações sobre mudanças climáticas globais. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Ed.). **Seqüestro de carbono: quantificação em seringais de cultivo e na vegetação natural**. Viçosa: Embrapa Solos, 2006. p. 43-75.

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

KE, D. S.; SUN, G. C.; WANG, A. G. The role of reactive oxygen in ethane-producing process by aetiolation seedlings of mung bean induced by low temperature. **Journal Plant Physiology and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 127–132, 2003.

KO, J. H.; CHOW, K. S.; HAN, K. H. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 53, n. 4, p. 479–492, Nov. 2003.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 13-21, 1997.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic, 1995.

LANZA, L. N. M.; ROSSI, S. C.; SODEK, L. Adubação nitrogenada beneficia soja alagada. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 2-9, 2013.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Annual Plant Reviews**, Washington, v.42, p. 1-40, 2011.

LEMOS, G. B. de et al. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 113-118, 1999.

LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWAR, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 118, p. 205–397, 2013.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**, Taipei, v. 25, n. 3, p. 148-157, July 2001.

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

MARTINAZZO, E. G. **Atividade fotossintética em plantas do gênero Prunus**. 2011. 59 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

MARTINAZZO, E. G. et al. Atividade fotossintética em plantas de ameixeira submetidas ao déficit hídrico e ao alagamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 1, p. 35-41, jan. 2013.

MATIMATI, I.; VERBOOM, G. A.; CRAMER, M. D. Nitrogen regulation of transpiration controls mass-flow acquisition of nutrients. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 159–168, Nov. 2014.

MAUREL, C. et al. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 595-624, 2008.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant Ecology**, Paranaque, v. 4, p.1-36, Mar. 2005.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília: Mapa, 2013.

MIYASHITA, Y.; GOOD, A. G. Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 1, p. 92–102, 2008.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 13, p. 3983–3998, Oct. 2013.

NASCIMENTO, M. N. **Enzimas envolvidas na hidrólise de sacarose em tecidos foliares e de casca e produção de mudas clonais por estaquia em seringueira**. 2010. 83 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

NAVARI-IZZO, F. et al. Water stress induced changes in protein and free amino acids in field-grown maize and sunflower. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 28, n. 4, p. 531-537, 1990.

OH, K.; KATO, T.; XU, H. L. Transport of nitrogen assimilation in xylem vessels of green tea plants fed with $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$. **Pedosphere**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 222-226, Apr. 2008.

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

OUKARROUM, A. et al. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 60, n. 3, p. 438-446, July 2007.

PALLARDY, S. G. Nitrogen metabolism. In: PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2008. Chap. 9, p. 233-254.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Oxford, v.195, n. 6, p. 442-454, Dec. 2009.

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

PIMENTEL, C. et al. Características fotossintéticas de *Phaseolus vulgaris* L. **Hoehnea**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 273-279, 2011.

QUICK, W. P. et al. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species under field conditions. **Plant, Cell & Environment**, London, v. 15, n. 1, p. 25-35, Jan. 1992.

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

RICARD, B. et al. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, n. 1, p. 1-10, 1994.

- ROLAND, P. et al. Lateral diffusion of CO₂ from shaded to illuminated leaf parts affects photosynthesis inside homobaric leaves. **The New Phytologist**, London, v. 169, n. 4, p. 779–788, 2006.
- ROSADO, P. L.; PIRES, M. D. M.; SANTOS, D. F. D. Borracha natural: mercado externo e interno. In: ALVARENGA, A. D. P. et al.(Org.). **Seringueira: aspectos econômicos e sociais e perspectivas para o seu fortalecimento**. Viçosa: Editora da UFV, 2006. p. 49-72.
- ROSSMANN, H.; GAMEIRO, M. B. P.; PEREZ, P. A competitividade da borracha natural no Brasil. In: GAMEIRO, A. H. (Org.). **Competitividade do agronegócio brasileiro: textos selecionados**. Santa Cruz do Rio Pardo: Editora Viena, 2006. p. 218-235.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E. et al. Ammonia production and assimilation: its importance as a tolerance mechanism during moderate water deficit in tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 8, p. 816–823, May 2011.
- SECCO, R. S. A botânica da seringueira [(*Hevea brasiliensis* (Willd. exAdr. Jussieu) Muell.Arg.)]. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Org.). **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, 2008. p. 3-24.
- SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br>>. Acesso em: 12 dez. 2013.
- SHAN, A. Y. K. V. et al. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 754-762, jun. 2012.
- SHARKEY, T. D. et al. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. **Plant, Cell & Environment**, London, v. 30, n. 9, p. 1035–1040, Sept. 2007.
- 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 & Cell Physiology**, Kioto, v. 54, n. 10, p. 1635-1647, Oct. 2013.

THOREN, D. et al. Influence of ambient light and temperature on laser-induced chlorophyll fluorescence measurements. **European Journal of Agronomy**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 169-176, Feb. 2010.

TOURNAIRE-ROUX, C. et al. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. **Nature**, London, v. 425, n. 6956, p. 393–97, Sept. 2003.

WALLSGROVE, R. M. et al. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. **Plant, Cell & Environment**, London, v. 6, n. 4, p. 301-309, June 1983.

WANG, R. et al. Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over one thousand rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-P, iron and sulfate metabolism. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, n. 2, p. 556–567, June 2003.

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

ZHANG, Y. P. et al. Effects of nitrogen forms on the growth and antioxidation enzyme activities of spinach. **Life Sciences and Agriculture Experiment Station**, Orono, v. 32, n. 2, p. 139–144, 2006.

CAPÍTULO 1

FOTORRESPIRAÇÃO E METABOLISMO ANTIOXIDATIVO EM SERINGUEIRA CULTIVADA SOB DIFERENTES FONTES NITROGENADAS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo obter um melhor entendimento de como as formas de nitrogênio (N) utilizadas no cultivo das plantas influenciam alguns aspectos metabólicos associados ao carbono (C) e N em seringueira. Para isso, plantas jovens foram cultivadas na ausência e na presença de N nas formas de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) com solução nutritiva de Bolle-Jones modificada, com N na concentração de 8mM nas seguintes proporções ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$): 8/0, 0/8 e 0/0. Após 4 meses de cultivo nessas condições, foram avaliadas as variáveis associadas ao processo fotossintético (trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, curva de CO_2 e fotorrespiração) e a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX). A taxa assimilatória líquida de CO_2 (A), a taxa de transporte de elétrons e o ponto de saturação de CO_2 foram maiores em plantas cultivadas com NO_3^- . Em contrapartida, as plantas cultivadas com NH_4^+ apresentaram as menores taxas fotossintéticas, em razão dos menores valores de $V_{c_{\max}}$, J, gm e J_{\max} , maior R_d , e também à maior atividade fotorrespiratória em relação às plantas tratadas com NO_3^- . A enzima SOD apresentou maior atividade nas folhas das plantas cultivadas na presença de N, sem diferença entre as fontes nitrogenadas, e aquelas tratadas com NO_3^- apresentaram menor atividade da CAT e maior atividade da APX. As plantas cultivadas na ausência de nitrogênio apresentaram os menores valores de A. Portanto, foi verificado que as diferentes fontes de N avaliadas afetaram significativamente o processo fotossintético em plantas de seringueira e o cultivo na presença de NH_4^+ favoreceu o processo fotorrespiratório nessas plantas.

Palavras-chave: nitrato, amônio, metabolismo do nitrogênio, fluorescência da clorofila, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

This study aimed to gain a better understanding of how forms of nitrogen (N) used in the cultivation of plants influence some metabolic aspects related to carbon (C) and N in rubber tree. For this, young plants were grown in the absence and presence of N in the form of nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) with nutrient solution Bolle-Jones modified with N at a concentration of 8 mM in the following proportions ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$): 8/0, 0/8 and 0/0. After 4 months of cultivation under these conditions, the variables associated with the photosynthetic process (gas exchange, chlorophyll fluorescence, photorespiration and CO_2 curve) and activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and APX) were evaluated. The net CO_2 assimilation rate (A), the rate of electron transport and CO_2 saturation point were higher in plants grown with NO_3^- . On the other hand, plants grown with NH_4^+ showed the lowest photosynthetic rates due to lower values of V_{cmax} , J, gm and J_{max} , higher Rd and also the higher photorespiratory activity compared to plants treated with NO_3^- . The SOD enzyme showed higher activity in leaves of plants grown in the presence of, without difference between the nitrogen sources, and those treated with NO_3^- showed lower CAT activity and increased activity of APX. Plants grown in the absence of nitrogen showed the lowest values of A. Therefore, it was found that the different N sources evaluated significantly affected the photosynthetic process in rubber plants and the cultivation in the presence of NH_4^+ favored photorespiratory process in these plants.

Keywords: nitrate, ammonium, nitrogen metabolism, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um elemento essencial ao metabolismo das plantas e sua deficiência é uma das limitações mais comuns para o desenvolvimento vegetal (PALLARDY, 2008). A preferência das plantas pela fonte de N pode variar, conforme as pressões seletivas e consequentes adaptações fisiológicas (TERCE-LAFORGUE; GISELA; HIREL, 2004). As formas mais comuns e disponíveis no solo são a forma nítrica (NO_3^-) e a amoniacal (NH_4^+), sendo a

primeira mais abundante e melhor assimilada pelas plantas (LEA; AZEVEDO, 2006), em consequência do processo de nitrificação por bactérias. Porém, a depender das condições do solo, a forma amoniacal pode ser a mais abundante pela inibição desses organismos (MILLER; CRAMER, 2005).

Uma vez nas folhas, sabe-se que diferentes fontes de N podem afetar diferentemente o metabolismo vegetal. Por exemplo, o acúmulo de NH_4^+ pode acarretar em decréscimo da fotossíntese (BLACKWELL; MURRAY; LEA, 1987), enquanto que o excesso de NO_3^- pode acarretar na formação de espécies reativas, induzindo estresse oxidativo (LI; WANG; STEWAR, 2013). O metabolismo do nitrogênio também está intimamente interligado ao do carbono (C), e o processo fotorrespiratório é um dos pontos de ligação entre estes, além de ser uma rota metabólica que produz continuamente espécie reativa de oxigênio.

A fotorrespiração é um dos maiores processos metabólicos associados com a fotossíntese (BYKOVA et al., 2014). Ocorre em três organelas: cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias, como consequência da oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) catalisada pela ribulose-1,5-bifosfato carboxilase /oxigenase (Rubisco), gerando uma molécula de 3-fosfoglicerato e outra de 2-fosfoglicolato. O 2-fosfoglicolato é hidrolisado a glicolato, que é transportado para o peroxissomo e oxidado a glioxilato, ocorrendo a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie reativa de oxigênio. O glioxilato é transaminado à glicina e transportado para as mitocôndrias onde é convertida em serina. Nessa etapa, ocorre a liberação de uma molécula de CO_2 e outra de NH_4^+ , que é transportada ao cloroplasto e entra no ciclo GS/GOGAT, para a formação de novos aminoácidos. A serina formada na mitocôndria é transportada para o peroxissomo, onde é transformada a hidroxipiruvato. Este é reduzido a glicerato e transportado de volta ao cloroplasto, onde é fosforilado, dando origem a uma molécula de 3-fosfoglicerato, que entra no ciclo de Calvin (WINGLER et al., 2000).

Desde o desenvolvimento dos analisadores portáteis de CO₂, tornou-se possível a avaliação da fotorrespiração, a partir das medidas das trocas gasosas. Essa técnica, apesar de possuir limitações quanto à determinação exata da intensidade da fotorrespiração, mostrou -se bem adaptada para a realização de estudos comparativos (DURING, 1988).

A atividade fotossintética de uma planta que apresenta metabolismo C₃, também pode ser avaliada mais claramente, por meio das curvas da taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), em função da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) e da concentração intercelular de CO₂ (C_i), o que permite um caminho para explorar com mais detalhes o nível da atividade fotossintética da folha (PIMENTEL et al., 2011). A modelagem da resposta da curva A/C_c (curva de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO₂ no sítio de carboxilação) auxilia nos cálculos de variáveis da cinética da Rubisco e da atividade fotoquímica (BERNACCHI et al., 2001), fornecendo informações para uma avaliação mais detalhada do processo fotossintético, através dos dados de parâmetros relacionados à fisiologia foliar (SHARKEY et al., 2007; PIMENTEL et al., 2011).

Uma outra técnica que permite obter informações sobre quase todos os aspectos da atividade fotossintética é o estudo da alteração da emissão da fluorescência da clorofila, em decorrência, principalmente, do FSII (PANDA; SHARMA; SARKAR, 2008). Essa ferramenta é muito utilizada para avaliar o desempenho fotossintético das plantas, principalmente por ser um método não invasivo, altamente sensível e de fácil manuseio, e por fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre a condição fisiológica do aparato fotossintético *in vivo* (BAKER, 2008; YUSUF et al., 2010).

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.), por ser a única espécie explorada comercialmente que produz quantidades de látex de alta qualidade para a produção de borracha natural (ROSADO; PIRES; SANTOS, 2006), possui um

grande potencial socioeconômico e ambiental. E apesar das pesquisas já existentes sobre o metabolismo do N com essa espécie, em especial a influência das fontes de N e suas diferentes concentrações no desenvolvimento das plantas (DELÚ-FILHO; OLIVEIRA; ALVES, 1997; LEMOS et al., 1999; ALVES, 2001; DINIZ, 2011; SHAN et al., 2012), a importância das fontes nitrogenadas sob a taxa de assimilação de CO₂ e o processo fotorrespiratório necessitam de uma melhor compreensão. Portanto, estudos que correlacionem o metabolismo do N e do C em plantas de seringueira precisam ser mais aprofundados, o que permitirão um melhor entendimento do comportamento fisiológico dessa espécie.

Nesse contexto, conduziu-se este trabalho, com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (NO₃⁻ e NH₄⁺) e da ausência deste, na fotossíntese, no funcionamento do processo fotorrespiratório e no metabolismo antioxidativo de plantas jovens de seringueira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

As sementes de seringueira foram coletadas no plantio multiclonal da “Fazenda Gundi” no município de Nepomuceno – MG e no entorno do setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, selecionadas quanto à uniformidade de cor e tamanho e colocadas para germinar em canteiros contendo areia lavada em água corrente e hipoclorito de sódio 0,5%. Ao atingirem o estágio palito, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade e transplantadas, em número de quatro, para vasos de 5L, contendo areia lavada nas mesmas condições descritas acima. As plantas foram irrigadas com água destilada por 120 dias, quando foram induzidas aos tratamentos através da irrigação, uma vez por semana, com solução

nutritiva de Bolle-Jones (1975), modificada por Lemos (1999), com nitrogênio na concentração de 8 mM, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) nas seguintes proporções $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0, 0/8 e 0/0. A temperatura, no período experimental, foi mantida entre 16°C (mínima) e 32°C (máxima).

Em cada vaso, foram adicionados 1000mL da solução nutritiva, cujo excesso foi retido nos pratos colocados sob eles. A cada 24 horas, o excesso foi retornado para os vasos, e o volume não retido pelo substrato foi completado com água destilada, de modo a uniformizar o volume para todos os vasos. As soluções foram aplicadas em intervalos de sete dias. Esse procedimento foi realizado até que as plantas atingissem sete meses, quando foram feitas as avaliações fotossintéticas e a coleta do material para as análises bioquímicas.

2.1. Características avaliadas

2.1.1. Avaliações fotossintéticas

As medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila foram realizadas no folíolo central do primeiro lançamento, totalmente expandido e sem problemas fitossanitários, no intervalo de 9 h às 11 horas da manhã, já que com a proximidade do horário de meio dia pode ocorrer o fechamento estomático, devido ao aumento da temperatura.

Foi realizada apenas uma avaliação pontual das trocas gasosas, medindo-se a taxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração intracelular de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a taxa transpiratória (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) com um sistema portátil de medição de fotossíntese modelo LI-6400 (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA) nos diferentes tratamentos, utilizando uma irradiância de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nas mesmas folhas, foram realizadas medidas de respiração no escuro, no período noturno, entre 19h e 20 horas.

A fotorrespiração (Fr) foi calculada, utilizando as expressões a seguir, de acordo com Sharkey (1988), segundo as equações 1 e 2:

$$FR = v_0/2(1)$$

$$v_0 = (A + Rd)/(1/\Phi - 0,5) (2)$$

onde v_0 é a taxa de oxigenação da Rubisco, A é taxa assimilatória líquida de CO_2 , Rd 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).

Nas mesmas folhas em que foram realizadas as análises de trocas gasosas, determinou-se a curva de resposta ao fluxo de fótons fotossintéticos com o auxílio de um fluorômetro portátil MINI-PAM (*Walz Inc.*). As avaliações foram feitas no período noturno, entre 19h e 20 horas, pois não havia grampos suficientes para adaptar as folhas ao escuro. Uma cinética rápida da fluorescência (CRF) foi construída com a aplicação de pulsos de saturação em intervalos de 0,8 minutos com intensidades de luz actínica, variando em cada intervalo (0, 170, 276, 408, 559, 1116, 1724 e 2458 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Usando as variáveis obtidas da fluorescência, a taxa de transporte de elétrons (ETR) e o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ), coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e eficiência fotoquímica potencial do FSII (F_v/F_m) foram calculados. O ETR e o NPQ foram calculados, segundo Krall e Edwards (1992) e Redondo-Gómez et al. (2008), respectivamente. A curva de ETR versus irradiância foi elaborada e a inclinação inicial da CRF (α), a taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max}) e a irradiância mínima de saturação (I_k) foram calculados de acordo com Eilers&Peeters et al. (1988).

O teor relativo de clorofila foi determinado nas mesmas folhas, utilizando um medidor portátil (clorofilômetro) da marca FT GREEN LLC e modelo atLEAF+.

2.1.2. Curvas de resposta da fotossíntese líquida à concentração de CO₂ no sítio de carboxilação (A/Cc)

As curvas de resposta da taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) ao aumento da concentração intercelular de CO₂ (C_i) foram realizadas variando-se a concentração de CO₂ na câmara de medida, somente nas plantas tratadas com nitrato e amônio.

Para a curva A/Cc, a irradiância foi mantida constante a 1000 μmol m⁻² s⁻¹, semelhante a das condições de crescimento das plantas, sendo a concentração de CO₂ modificada gradualmente. Os valores das concentrações de CO₂ variaram de 0 à 1500 μmol mol⁻¹, em intervalos crescentes de 100 μmol mol⁻¹.

Para equilibrar o aparelho, a concentração inicial de CO₂ na câmara (C_a) foi ajustada para 200 μmol mol⁻¹, sendo reduzida, gradualmente, até 0 μmol mol⁻¹. Para a realização das medições, a concentração de CO₂, na câmara, foi aumentada até 1.500 μmol mol⁻¹. Esse procedimento, foi realizado para evitar oscilações estomáticas, principalmente sob altos valores de C_a (PIMENTEL et al., 2007).

Para a elaboração da curva, foi utilizado o modelo bioquímico desenvolvido por Farquhar, Von Caemmerer e Berry (1980) para plantas C₃, utilizando-se valores de C_c, ao invés de C_i, por meio do programa desenvolvido por Sharkey et al. (2007) 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:

$$A_c = \frac{(C_c - \Gamma^*)V_{cmax}}{C_c + K_c(1 + \frac{O}{K_o})} - R_c \quad (3)$$

$$A_j = J_{max} \frac{C_i - \Gamma^*}{4C_i - 8\Gamma^*} \quad (4)$$

$$A_p = 3TPU \quad (5)$$

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 e TPU a utilização da triose fosfato.

2.1.3. Avaliações bioquímicas

2.1.3.1. Enzimas do Metabolismo Antioxidante

Folhas novas e completamente expandidas foram coletadas, pesadas, acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em ultrafreezer a $-80^\circ C$ para as posteriores análises. A quantificação das atividades enzimáticas, envolvidas na resposta antioxidante, seguiu os protocolos de rotina do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas da UFLA.

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, aproximadamente 200 mg de lâminas foliares foram macerados, separadamente, em N_2 líquido acrescido de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) insolúvel, para que não houvesse oxidação e, homogeneizados em 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 e armazenado em ultrafreezer para posteriores análises das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX).

A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução 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 fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da CAT foi determinada conforme Havir e 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 $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, conforme descrito por Azevedo et al. (1998), com pequenas modificações.

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

2.2. Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em delineamento experimental completamente casualizado. Para os parâmetros fotossintéticos, seis plantas foram utilizadas, correspondendo às repetições (n=6), enquanto que, para as avaliações de enzimas antioxidantes foram utilizadas quatro plantas (n=4). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1. Fotossíntese e fotorrespiração

A taxa assimilatória líquida de CO_2 (A) foi favorecida pela presença de nitrogênio, em especial em plantas tratadas com NO_3^- ($P < 0.05$), enquanto que a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E) e a concentração intracelular de CO_2 (C_i) das folhas não diferiram entre os tratamentos ($P > 0.05$) (Figura 1).

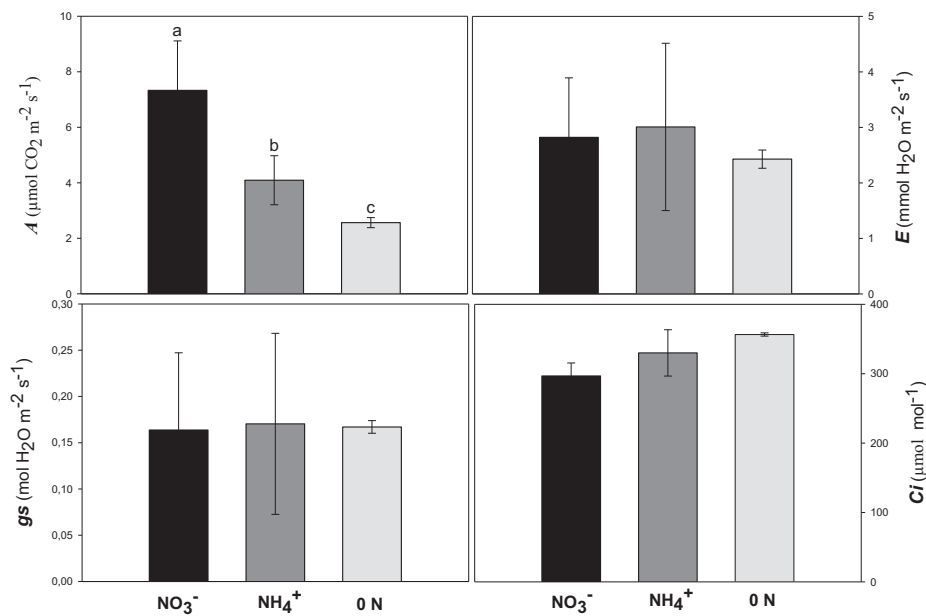


Figura 1 Taxa assimilatória líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E) e concentração intracelular de CO_2 (C_i) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições. Médias seguidas por letras diferentes representa diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Scott-Knott.

Pelo estudo da fluorescência da clorofila, verificou-se que a taxa de transporte de elétrons (ETR) foi maior em plantas cultivadas com NO_3^- e o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) menor em plantas sem nitrogênio (0 N) (Figura 2).

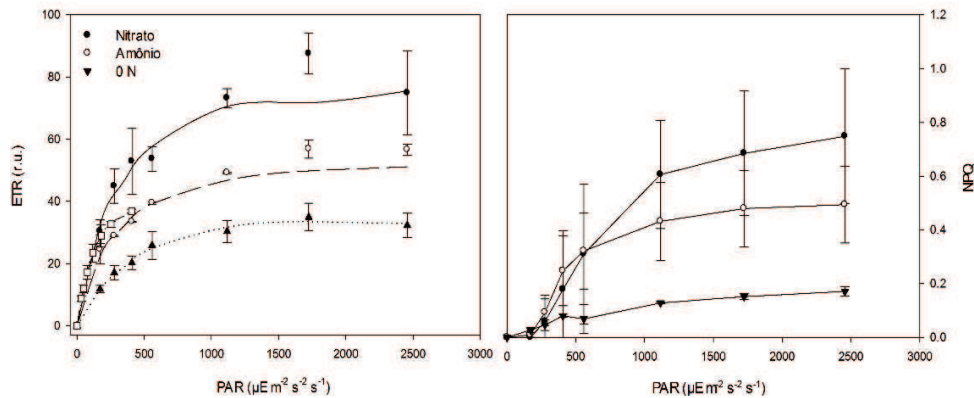


Figura 2 Taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições.

O coeficiente de extinção fotoquímico a $1116 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (qP_{1116}) (condi\u00e7\u00e3o de irradi\u00e2ncia mais semelhante \u00e0s condi\u00e7\u00f5es de crescimento das plantas) e a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica potencial do FSII (F_v/F_m) foram menores em plantas cultivadas na aus\u00eancia de nitrog\u00eanio e semelhantes entre as plantas cultivadas com NO_3^- e NH_4^+ ($P < 0.05$, Tabela 1). A taxa m\u00e1xima de transporte de \u00e9trons (ETR_{max}) foi favorecida pela presen\u00e7a do nitrog\u00eanio e, em maior intensidade, nas plantas tratadas com NO_3^- ($P < 0.05$). A inclina\u00e7\u00e3o inicial da CRF (α) foi menor em plantas cultivadas na presen\u00e7a de nitrog\u00eanio. Similarmente, a irradi\u00e2ncia m\u00ednima de satura\u00e7\u00e3o (I_k) foi menor em plantas cultivadas na presen\u00e7a de N, em especial as tratadas com NH_4^+ . Os teores de clorofila foram maiores em plantas cultivadas na aus\u00eancia de N (Tabela 1).

Em raz\u00e3o das diferen\u00e7as verificadas nas vari\u00e1veis relacionadas \u00e0 fotoss\u00edntese de plantas submetidas \u00e0s diferentes fontes de N (A, ETR, ETR_{max} e I_k), uma curva da rela\u00e7\u00e3o entre a taxa fotossint\u00e9tica (A) e concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 no cloroplasto (C_c) foi elaborada para esses tratamentos (Figura 3).

Observou-se que o ponto de saturação de CO₂ nas plantas tratadas com NO₃⁻ (9,74 μmol m⁻² s⁻¹) foi superior ao das cultivadas com NH₄⁺ (8,19 μmol m⁻² s⁻¹).

Tabela 1. Coeficiente de extinção fotoquímico (qP), eficiência fotoquímica potencial do FSII (Fv/Fm), taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max}), inclinação inicial da CRF (α), irradiância mínima de saturação (I_k) e conteúdo de clorofila de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺) e na ausência de N (0 N). Valores representam média ± desvio padrão de seis repetições.

Tratamentos	qP ₁₁₁₆	Fv/Fm	ETR _{max}	α	I _k	Clorofila
NO ₃ ⁻	1,07a	0,75a	78,73a	1,32b	324,94b	35,99 b
NH ₄ ⁺	1,75a	0,76a	50,64b	1,32b	210,55c	24,93c
0 N	0,58b	0,68b	33,77c	1,47a	469,11a	42,70a

Valores representam média de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0.05).

Semelhante à curva A/Cc, a caracterização *in vivo* da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), da taxa de transporte elétrons (J), da utilização da triose fosfato (TPU), da respiração mitocondrial (Rd), da condutância mesofílica (gm) e a velocidade máxima de transporte elétrons (J_{max}) foram determinadas para os tratamentos com as fontes nitrogenada (Tabela 2). Plantas tratadas com NH₄⁺ apresentaram menores V_{cmax}, J, gm e J_{max}, e maior Rd em relação às plantas tratadas com NO₃⁻.

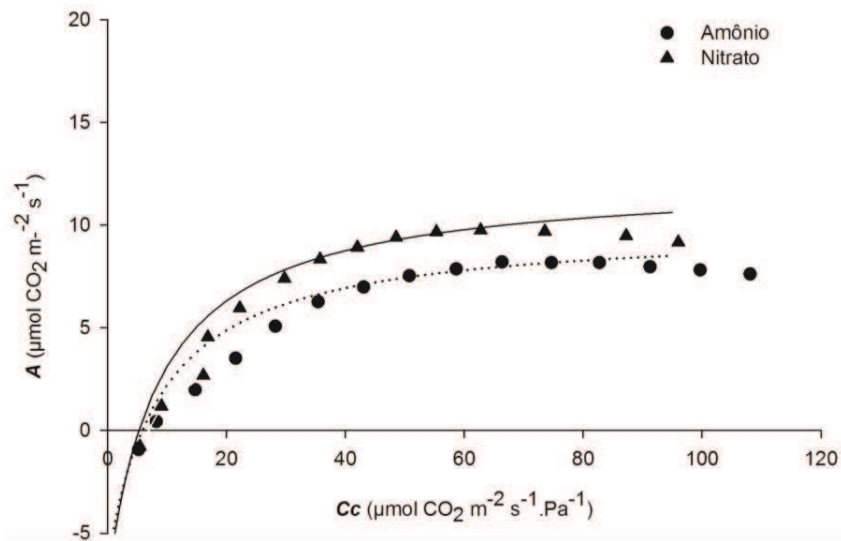


Figura 3 Taxa fotossintética (A) em função da concentração interna de CO₂ no cloroplasto (C_c) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato e amônio.

Tabela 2. Variáveis para a caracterização *in vivo* da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), taxa de transporte elétrons (J); utilização da triose fosfato (TPU); respiração mitocondrial (Rd); condutância mesofilica e (g_m) da velocidade máxima de transporte elétrons (J_{max}) determinadas por medidas de trocas gasosas em plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺).

Parâmetros	Nitrato	Amônio
V_{cmax} (µmol m ⁻² s ⁻¹)	42a	33b
J (µmol m ⁻² s ⁻¹)	52a	43b
TPU (µmol m ⁻² s ⁻¹)	3,4a	3,0a
Rd (µmol m ⁻² s ⁻¹)	0,83b	0,98a
g_m (µmol m ⁻² s ⁻¹ .Pa ⁻¹)	30a	17,99b
J_{max} (µmol m ⁻² s ⁻¹)	53,03a	43,96b

A atividade fotorrespiratória foi favorecida pela presença do nitrogênio, sendo maior no tratamento com NH_4^+ (Figura 4).

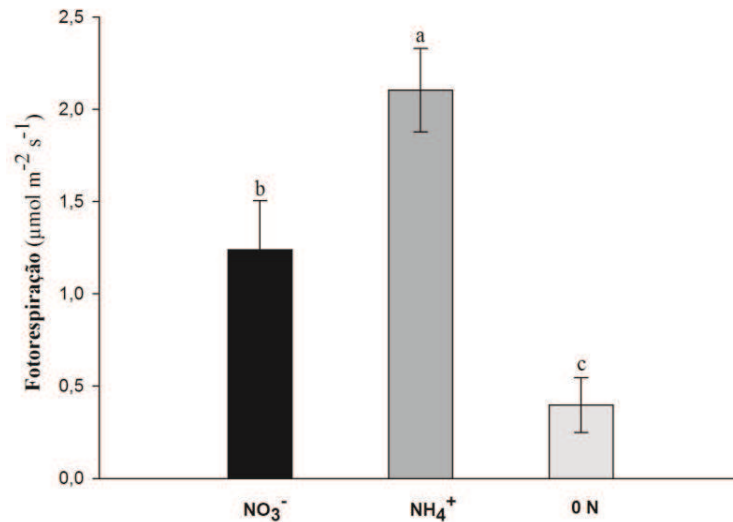


Figura 4 Fotorrespiração em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições. Médias seguidas por letras diferentes representam diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Scott-Knott.

3.2. Enzimas do Metabolismo Antioxidante

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi maior nas folhas das plantas cultivadas na presença de N (NO_3^- e NH_4^+). (Figura 5). Enquanto isso, plantas tratadas com NO_3^- apresentaram menor atividade da catalase (CAT) e maior atividade da ascorbato peroxidase (APX) (Figura 5).

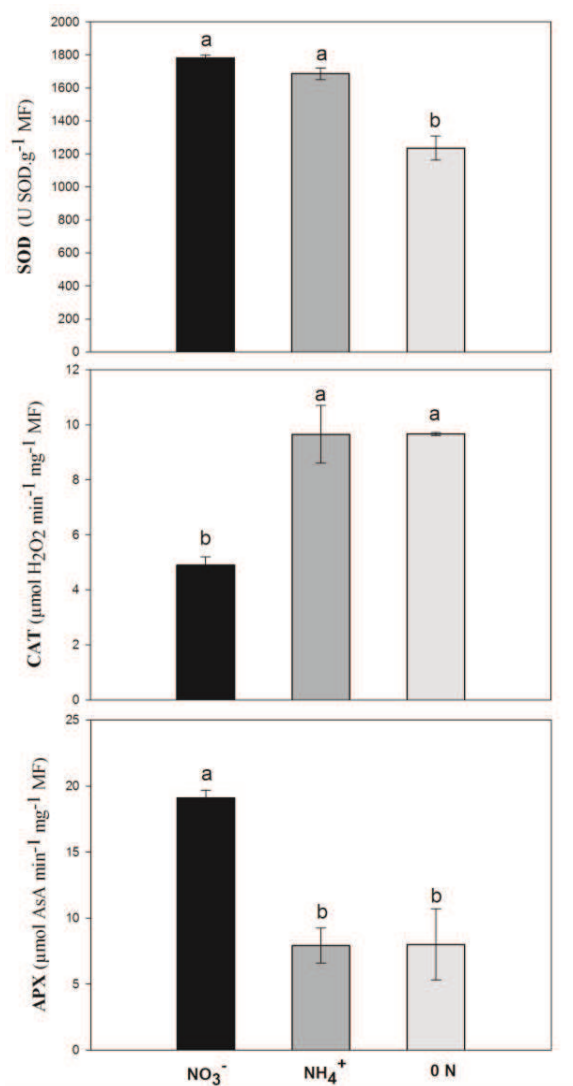


Figura 5 Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições. Médias seguidas por letras diferentes representam diferença significativa ao nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Scott-Knott.

4 DISCUSSÃO

A importância do fornecimento das fontes nitrogenadas no metabolismo fotossintético foi verificada. As plantas cultivadas sem fonte de nitrogênio apresentaram os menores valores de A . Desde que não foram verificadas diferenças na condutância estomática (g_s), na taxa transpiratória (E) e na concentração intracelular de CO_2 (C_i) das folhas entre os tratamentos, a assimilação de carbono em plantas cultivadas na ausência de nitrogênio não foi limitada pelas trocas gasosas. Isso sugere que a carência de nitrogênio, elemento essencial para a síntese de proteínas, pode acarretar uma severa deficiência da Rubisco, a enzima responsável pela assimilação do carbono em cloroplasto de plantas C_3 , e de todo o complexo enzimático das plantas.

A menor taxa de carboxilação pela Rubisco também pode justificar o menor fluxo de elétrons pelo fotossistema II (ETR) apresentado por essas plantas (Figura 2). O nitrogênio é um elemento necessário para a síntese de clorofila, pigmento essencial para a atividade dos fotossistemas (FS). Porém, verificou-se que plantas cultivadas na ausência de nitrogênio apresentaram maior conteúdo de clorofila que as demais (Tabela 1). A utilização do N na produção de clorofila pode ser uma estratégia da planta visando a garantir uma adequada captação de energia luminosa pelos fotossistemas. As clorofilas são responsáveis pela captação da luz no complexo antena, além de serem componentes primordiais dos centros de reação nos fotossistemas. De fato, verifica-se que plantas desprovidas de N apresentam maior irradiância mínima de saturação (I_k), o que indica maior quantidade de centros de reação do fotossistema II (FSII). Portanto, provida de um maior número de centros de reação do FSII, as plantas do tratamento sem fonte nitrogenada são capazes de absorver maior quantidade de energia, apresentando, conseqüentemente, saturação em irradiâncias maiores. Porém, essas plantas também apresentam menor coeficiente de extinção fotoquímico (qP), um

indicador da proporção do FSII que está aberta (MAXWELL et al., 2000), representando o balanço entre a excitação dos centros reacionais do FSII e a remoção de elétrons do FSII pela cadeia de transporte de elétrons (CAMPBELL et al., 1998). Menor qP está de acordo com o menor ETR apresentado por essas plantas. Portanto, mesmo com emprego do N para a constituição do aparato fotoquímico, a redução na taxa assimilatória de carbono em plantas desprovidas de fonte nitrogenada (provavelmente, decorrente da menor quantidade de Rubisco) é um fator limitante para a atividade fotoquímica em seus cloroplastos.

Além de sua função no processo fotossintético, o nitrogênio mostrou-se importante para evitar o estresse oxidativo em plantas de seringueira. O menor ETR em plantas cultivadas sem fonte nitrogenada indica menor utilização da energia luminosa no processo fotoquímico. O menor qP nessas plantas indica que as clorofilas excitadas nos centros de reação não são reoxidadas pela quinona na cadeia de transporte de elétrons, formando clorofila no estado excitado singleto. Essas plantas também apresentam menor NPQ. O NPQ está envolvido na desativação das clorofilas no estado excitado singleto, reduzindo a formação de oxigênio singleto (1O_2), evitando danos oxidativos ao fotossistema (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 2000). Menor NPQ serve como um indicativo para maior produção de EROs (HIDEG; KÓS; SCHREIBER, 2008). O estresse oxidativo pode, portanto, estar contribuindo para a menor eficiência fotoquímica potencial do FSII (F_v/F_m) apresentada pelas plantas cultivadas na ausência de N. Tais plantas apresentaram elevada atividade da CAT, um indicativo da presença de elevadas quantidades de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A CAT é a principal enzima responsável pela quebra dessa molécula, formando água (H_2O) e oxigênio (O_2) como produtos finais, estando ativa, principalmente, quando o H_2O_2 se encontra em altas concentrações (FOYER; FLETCHER, 2001).

A avaliação das enzimas do sistema antioxidante sugere que o aumento da atividade da SOD e da APX em plantas tratadas com NH_4^+ está relacionado à

maior taxa fotossintética apresentada por essas plantas. EROs são, constantemente, formadas durante o processo fotossintético (FOYER; FLETCHER, 2001). Os íons superóxidos formados durante a fotólise da água na cadeia de transporte de elétrons são, rapidamente, convertidos a H_2O_2 pela atividade da SOD. Por sua vez, o H_2O_2 é reciclado à água e oxigênio pelas atividades da CAT e APX (FOYER; FLETCHER, 2001). A SOD, dentre as enzimas envolvidas na remoção das EROs, é considerada uma enzima-chave por ser a primeira a atuar no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (POMPEU et al., 2008). A APX e outras peroxidases, têm alta afinidade, eliminado o H_2O_2 , quando em baixas concentrações, e são as principais responsáveis pela eliminação de H_2O_2 nos cloroplastos, enquanto a CAT atua, principalmente, nos peroxissomos (JALEEL et al., 2009).

Em se tratando do metabolismo em plantas cultivadas na presença de nitrogênio, verificou-se que as diferentes fontes afetam, significativamente, o processo fotossintético em plantas de seringueira. Plantas cultivadas com NH_4^+ apresentaram menores taxas fotossintéticas (A) e menor ETR, em relação às plantas cultivadas com NO_3^- .

Para melhor compreender os efeitos das diferentes fontes de N no processo fotossintético, a curva A/C_c foi elaborada e, a partir desse modelo, foram ajustados os valores de V_{cmax} , J , TPU, R_d , g_m e J_{max} (FARQUHAR; VON CAEMMERER; BERRY, 1980; FARQUHAR; VON CAEMMERER, 1982). Verifica-se que a limitação da atividade fotossintética de plantas tratadas com NH_4^+ é decorrente da menor velocidade de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), o que corrobora com a menor ETR também verificada nessas plantas. Limitações na etapa de assimilação de carbono são reconhecidas por também limitarem a etapa fotoquímica por feedback negativo. Além disso, menores taxas de assimilação de carbono podem contribuir para o menor ponto de saturação de CO_2 verificado em plantas tratadas com NH_4^+ (em relação às tratadas com NO_3^-).

Porém, surge a questão: Por que o tratamento com NH_4^+ causa limitação na atividade carboxilase da Rubisco, quando comparada às plantas cultivadas com NO_3^- ? A resposta pode ser obtida pela análise dos seguintes resultados em plantas tratadas com NH_4^+ : 1) menor V_{cmax} da Rubisco pode estar relacionada à uma maior atividade oxigenase da enzima; 2) o aumento da respiração mitocondrial (Rd) pode estar relacionado a maior demanda de ATP por parte da enzima glutamina sintetase, durante o processo fotorrespiratório; 3) em mesmas condições de g_s e C_i , verificou-se uma menor condutância do mesofilo (g_m) o que pode acarretar em menor difusão de CO_2 entre as células do mesofilo e, conseqüentemente, à um enriquecimento da pressão parcial de oxigênio nas células, o que favorece a fotorrespiração; 4) a maior atividade de CAT indica maior produção/degradação de H_2O_2 , proveniente da conversão de glicolato a glioxilato, durante o processo fotorrespiratório e, finalmente, 5) a atividade fotorrespiratória foi de fato maior nessas plantas. Portanto, apesar de fornecer os requerimentos adequados de nitrogênio, o tratamento de plantas de seringueira com NH_4^+ favorece a atividade fotorrespiratória, reduzindo o processo fotossintético. Porém, os mecanismos envolvidos nesse processo devem ser mais estudados visando a melhor compreensão dos metabolismos do carbono e nitrogênio em seringueira e em outras espécies. A utilização de isótopos estáveis (^{15}N) seria uma alternativa para o esclarecimento dessa questão.

5 CONCLUSÃO

Verificou-se que o cultivo das plantas jovens de seringueira na presença de NH_4^+ favoreceu o processo fotorrespiratório, acarretando na diminuição das taxas de assimilação de carbono, quando comparadas às plantas cultivadas com NO_3^- .

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280–292, Oct. 1998.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89-113, 2008.
- BERNACCHI, C. et al. Improved temperature response functions for models of rubisco-limited photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 253-259, Feb. 2001.
- BLACKWELL, R. D.; MURRAY, A. J. S.; LEA, P. J. Inhibition of photosynthesis in barley with decreased levels of chloroplastic glutamine synthetase activity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1799-1809, 1987.
- BOLLE-JONES, E. W. Cooper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 168-178, 1957.
- BYKOVA, N. V. et al. The function of glycine decarboxylase complex is optimized to maintain high photorespiratory flux via buffering of its reaction products. **Mitochondrion**, Amsterdam, n. 14, p. 2-6, Jan. 2014.
- CAMPBELL, D. et al. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 667–683, 1998.
- DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 21, p. 329-336, 1997.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Harvesting sunlight safely. **Nature**, London, v. 403, p. 371–374, 2000.

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

DURING, H. CO₂ assimilation and photorespiration of grapevines leaves: responses to light and drought. **Vitis**, Siebeldingen, v. 27, p. 199-208, 1988.

EILERS, P. H. C.; PEETERS, J. C. H. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 42, n. 3-4, p. 199-215, Sept. 1988.

FARQUHAR, G. D.; VON CAEMMERER, S. Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In: LANGE, O. L. et al. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p. 459-587.

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

FOYER, C. H.; FLETCHER, J. M. Plant antioxidants: colour me healthy. **Biologist**, London, v. 48, n. 3, p. 115-120, June 2001.

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

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

HIDEG, E.; KÓS, P. B.; SCHREIBER, U. Imaging of NPQ and ROS formation in tobacco leaves: heat inactivation of the water-water cycle prevents down-regulation of PSII. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 12, p. 1879-1886, Dec. 2008.

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

KRALL, J. P.; EDWARDS, G. E. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 86, n. 1, p. 180–187, Sept. 1992.

LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 49, n. 3, p. 243-247, Dec. 2006.

LEMOS, G. B. de et al. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 113-118, 1999.

LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWAR, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 118, p. 205–397, 2013.

MAXWELL, K. et al. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 345, p. 659–668, Jan. 2000.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant Ecophysiology**, Paranaque, v. 4, p.1-36, Mar. 2005.

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

PALLARDY, S. G. Nitrogen metabolism. In: PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2008. Chap. 9, p. 233-254.

PANDA, D.; SHARMA, S. G.; SARKAR, R. K. Chlorophyll fluorescence parameters, CO₂ photosynthetic rate and regeneration capacity as a result of complete submergence and subsequent re-emergence in rice (*Oryza sativa* L.). **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 127–133, Feb. 2008.

PIMENTEL, C. et al. Características fotossintéticas de *Phaseolus vulgaris* L. **Hoehnea**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 273-279, 2011.

PIMENTEL, C.; BERNACCHI, C.; LONG, S. Limitations to photosynthesis at different temperatures in the leaves of *Citrus limon*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 2, p. 141-147, Apr./June 2007.

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

REDONDO-GÓMEZ, S. et al. Carry-over of differential salt tolerance in plants grown from dimorphic seeds of *Suaeda splendens*. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 1, p. 103–112, July 2008.

ROSADO, P. L.; PIRES, M. D. M.; SANTOS, D. F. D. Borracha natural: mercado externo e interno. In: ALVARENGA, A. D. P. et al.(Org.). **Seringueira: aspectos econômicos e sociais e perspectivas para o seu fortalecimento**. Viçosa: Editora da UFV, 2006. p. 49-72.

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

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

SHARKEY, T. D. et al. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. **Plant, Cell & Environment**, London, v. 30, n. 9, p. 1035–1040, Sept. 2007.

TERCE-LAFORGUE T.; GISELA, M.; HIREL, B. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants grown under different nitrogen regimes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 2, p. 220-228, 2004.

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

YUSUF, M. A. et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochemical and Biophysical Acta**, Amsterdam, v. 1797, n. 8, p. 1-11, Aug. 2010.

CAPÍTULO 2

TROCAS GASOSAS E METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS DE SERINGUEIRA SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO E ALAGAMENTO

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se avaliar a influência de duas fontes nitrogenadas (nitrato- NO_3^- e amônio- NH_4^+) e da baixa disponibilidade hídrica e de oxigênio no substrato sobre as trocas gasosas, o metabolismo do nitrogênio (N), antioxidativo e transporte de aminoácidos pelo xilema em plantas jovens de seringueira. As plantas foram cultivadas em areia, utilizando solução nutritiva de Bolle-Jones na ausência de N e na presença de N com concentração de 8 mM nas seguintes proporções $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0, 0/8 e 0/0. Trinta dias após o cultivo das plantas nessas condições, para simulação dos estresses hídrico e gasoso, as plantas foram submetidas à baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO), estabelecendo-se os seguintes tratamentos: plantas cultivadas na presença de NO_3^- irrigadas à 10% (NO_3^- DH) e 100% (NO_3^- CC) da capacidade de campo (CC) e alagadas (NO_3^- A) através da submersão das raízes; na presença de NH_4^+ irrigadas à 10% (NH_4^+ DH) e 100% da CC (NH_4^+ CC) e alagadas (NH_4^+ A); e plantas cultivadas na ausência de N irrigadas à 10% (0N DH) e 100% da CC (0N CC) e alagadas (0N A). Após 7, 14 e 21 dias da indução dos tratamentos com limitação de água e oxigênio, foram avaliadas as trocas gasosas, a atividade de algumas enzimas do metabolismo do N (GS/NADH-GOGAT/GDH) e antioxidativo (SOD, CAT e APX) em folhas e raízes, e também a quantificação de aminoácidos presentes na seiva do xilema. A taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (*gs*) e transpiração (*E*) foram fortemente diminuídas, a partir do 14º dia de avaliação nas plantas sob déficit hídrico. Foi observada diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), exatamente quando aumenta a produção do aminoácido GABA nas plantas sob estresse, em maior intensidade naquelas cultivadas com amônio e na ausência de N sob deficiência de O_2 , e na última avaliação em todas as plantas sob déficit hídrico. Os níveis de acúmulo do GABA, nesse momento, sugere uma manifestação metabólica de estresse severo.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*, fontes nitrogenadas, estresse hídrico, trocas gasosas, GABA, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the influence of two nitrogen sources (nitrate- NO_3^- e ammonium- NH_4^+) and low water availability and low oxygen availability in the substrate on gas exchange, metabolism of nitrogen (N), antioxidant and amino acid transport through the xylem in young rubber plants. Plants were grown in sand with nutrient solutions Bolle-Jones in the N absence and N presence of a concentration of 8 mM in the following proportions $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0, 0/8 e 0/0. Thirty days after the cultivation of plants under these conditions, for simulation of gas and water stress, plants were subjected to low water availability (LWA) and low oxygen availability (LOA) establishing the following treatments: plants grown in the presence of NO_3^- irrigated to 10% and 100% of available water capacity in the substrate, and flooded by submerging the roots; grown in the presence of NH_4^+ irrigated at 10% and 100% of available water capacity in the substrate and flooded plants, and plants grown in the nitrogen absence irrigated at 10% and 100% of available water capacity in the substrate and flooded. After 7, 14 and 21 days of treatment induction with limited water and oxygen, gas exchange, the activity of some enzymes of N metabolism (GS / NADH-GOGAT / GDH) and antioxidant (SOD, CAT and APX) in leaves and roots and also the quantification of amino acids in the xylem sap were evaluated. The photosynthetic rate (A), stomatal conductance (gs) and transpiration (E) were strongly decreased from the 14th day assessment in plants under water stress. Decreased antioxidant enzymes activity (SOD and CAT) exactly when production increases the amino acid GABA in plants under stress at a higher intensity in plants grown with ammonium and in the N deficiency under O_2 absence, and the last evaluation was observed in all plants under water deficit. The levels of accumulation of GABA at this time suggests a metabolic manifestation of severe stress.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, nitrogen sources, water stress, gas exchange, GABA, antioxidant enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da seringueira (*Hevea brasiliensis*), principal espécie produtora de borracha natural do mundo, expandiu-se para além de sua área de origem, as chamadas áreas de escape, sendo cultivada em climas distintos aos das condições

nativas (CONFORTO, 2008). Esse fator, juntamente com o cenário atual de mudanças climáticas que indicam a ocorrência de eventos extremos com maior frequência nos próximos anos, implicam na necessidade de estudos relacionados às respostas fisiológicas e ao comportamento dessa espécie em condições adversas, como limitação de água e/ou encharcamento do solo.

O decréscimo no suprimento hídrico é o maior problema enfrentado pela agricultura (HU; XIONG, 2014). Esse fator desencadeia várias respostas nas plantas como: a redução do crescimento decorrente da diminuição da expansão celular, fechamento estomático que provoca a redução da taxa fotossintética, em razão do declínio da condutância estomática e, conseqüentemente, a diminuição da concentração interna de CO₂, além do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, promovendo estresse oxidativo (HONG-BO et al., 2008; KAR, 2011).

O excesso de água no sistema radicular em plantas terrestres é também um fenômeno comum à agricultura, principalmente em solos poucos drenados após um período de fortes chuvas, podendo ser prejudicial ou, até mesmo, letal às plantas (DREW, 1997; LANZA; ROSSI; SODEK, 2013). A saturação hídrica do solo cria um ambiente hipóxico (baixa concentração de O₂) ou anóxico (ausência de O₂) pela eliminação dos espaços anteriormente ocupados pelo ar, afetando, fortemente, a capacidade de sobrevivência das plantas, o que limita as trocas gasosas, decorrente do aumento da resistência estomática, diminui a fotossíntese e a condutividade hidráulica das raízes e ainda reduz a translocação de fotoassimilados (PARENT et al., 2008).

Sabe-se que a sobrevivência das plantas terrestres depende da capacidade das raízes em obter água e nutrientes do solo (MAGALHÃES FILHO et al., 2008). Geralmente, a seca diminui a absorção de nutrientes pelas raízes e o transporte à parte aérea, em razão da redução da taxa transpiratória (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011). Em plantas alagadas, quando a respiração aeróbica

cessa nas raízes, ocorre queda nos níveis de energia (ATP), logo, a absorção e transporte de íons é reduzida (KOZLOWSKI, 1997). Portanto, tanto a baixa disponibilidade de água (BDA), quanto a baixa disponibilidade de oxigênio (BDO), no substrato, interferem na absorção de nutrientes pelas plantas.

O nitrogênio (N) é um dos elementos minerais mais limitantes para o desenvolvimento vegetal, requerido em grande quantidade e essencial à bioquímica de compostos enzimáticos e não enzimáticos como coenzimas, pigmentos fotossintéticos e metabólitos secundários (MAATHUIS, 2009). A preferência da planta pela fonte nitrogenada é imposta pelas pressões seletivas e adaptações fisiológicas, e dependem de vários fatores como a necessidade de N na planta, a energia disponível para assimilá-lo, a fonte disponível no ambiente e a localização e regulação das enzimas envolvidas nesse processo, que determinam os órgãos ou os sítios de ligação (TERCÉ-LAFORGUE; GISELA; HIREL, 2004).

Nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) são as principais formas minerais disponíveis no solo para serem absorvidos pelas raízes, que, em seguida, passam por complexos sistemas de assimilação, transformação e mobilização dentro das plantas (OH; KATO; XU, 2008). Após absorvidas, altas concentrações de NH_4^+ é tóxico para planta e deve ser rapidamente assimilado a compostos orgânicos (LINKA; WEBER, 2005), sendo a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) as enzimas chave nesse processo, uma vez que a glutamato desidrogenase (GDH) trabalha mais no sentido de desaminação (TERCÉ-LAFORGUE et al., 2013).

Sabe-se que o metabolismo do nitrogênio é afetado pelo estresse hídrico, entretanto, pouco se conhece a respeito do comportamento das enzimas envolvidas nesse processo diante de condições de estresse. Existem evidências de que a adição de nitrato em condições de alagamento do sistema radicular (hipoxia) promove tolerância ao estresse, porém os mecanismos bioquímicos envolvidos

nessa tolerância são, ainda, pouco conhecidos (MALAVOLTA, 1954; BRANDÃO; SODEK, 2009; LANZA; ROSSI; SODEK, 2013).

O N assimilado é transportado da raiz à parte aérea, principalmente, na forma de aminoácidos através do xilema, por isso, a partir da análise da seiva do xilema, pode-se obter informações qualitativas e quantitativas acerca do transporte de N em plantas (SAWAZAKI; SODEK; TEIXEIRA, 1987). Em seringueira, já foi detectado que, em baixa disponibilidade de oxigênio no solo, ocorre o aumento de aminoácidos livres na seiva do xilema, a exemplo de Alanina (ALA) e ácido γ -aminobutírico (GABA) (CARVALHO et al., 2013), o que pode estar relacionado ao ajustamento no metabolismo celular para a planta tolerar o estresse. Sob déficit hídrico, o acúmulo de aminoácidos livres poderia contribuir para a tolerância da planta, pelo aumento do potencial osmótico ou como uma reserva de nitrogênio (NAVARI-IZZO et al., 1990), porém, em seringueira, estudos que correlacionem fontes nitrogenadas e os aminoácidos transportados na seiva do xilema em plantas sob déficit hídrico são ainda necessários.

O GABA é um aminoácido não proteico que se acumula rapidamente em tecidos de plantas em respostas a estresses bióticos e abióticos, e tem sido associado às várias respostas fisiológicas como metabolismo do nitrogênio (armazenamento e/ou transporte de N), osmorregulação, sinalização e também proteção contra estresse oxidativo (BOUCHÉ; FROMM, 2004; ROBERTS, 2007). A ligação entre o GABA e assimilação de NO_3^- e NH_4^+ em plantas de seringueira sob estresses hídrico e gasoso ainda não são claras e necessitam de investigação mais aprofundada.

O conhecimento das alterações fisiológicas e bioquímicas em seringueira, sob diferentes condições hídricas e fontes nitrogenadas, é essencial para o entendimento geral dos mecanismos de tolerância dessa espécie, principalmente porque as informações existentes sobre a seringueira nessas condições são bem escassas. Portanto, neste trabalho, objetivou-se avaliar a influência da ausência de

N e presença de duas fontes nitrogenadas (NO_3^- e NH_4^+), da baixa disponibilidade hídrica e de oxigênio no substrato sobre as trocas gasosas, o metabolismo do nitrogênio, antioxidativo e transporte de aminoácidos na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no período de março a novembro de 2013. As sementes de seringueira foram coletadas no plantio multiclonal da “Fazenda Gundi” no município de Nepomuceno – MG e no entorno do setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, selecionadas quanto à uniformidade de cor e tamanho e colocadas para germinar em canteiros contendo areia lavada em água corrente e com hipoclorito de sódio 0.5%.

Ao atingirem o estágio palito, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade e transplantadas, em número de duas, para vasos de 5L contendo areia lavada nas mesmas condições descritas acima, totalizando oito vasos por tratamento. Após o transplante para os vasos, as plantas foram irrigadas com água destilada, durante cinco meses, quando foram induzidas aos tratamentos através da irrigação, uma vez por semana, com solução nutritiva de Bolle-Jones (1957), modificada por Lemos et al. (1999) conforme tabela 1, com nitrogênio na concentração de 8 mM, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) nas seguintes proporções $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0, 0/8 e 0/0. Na primeira semana, utilizou-se solução nutritiva com meia força iônica, seguida da força total nas semanas seguintes. A temperatura no período experimental foi mantida entre 17,1°C (mínima) e 33°C (máxima).

Um mês após o início da aplicação da solução nutritiva, as plantas foram separadas em três tratamentos: um controle, onde foram irrigadas até a capacidade de campo; o segundo simulando o estresse hídrico, as plantas foram mantidas sob restrição hídrica severa, sendo irrigadas à 10% da capacidade de campo; e o terceiro, simulando o estresse gasoso, pela deficiência de O₂ (hipoxia), os vasos, nos quais as plantas estavam sendo cultivadas, foram colocados dentro de baldes maiores e as raízes alagadas com uma lâmina d'água de 4cm acima do coletor. Foram utilizadas soluções nutritivas diluídas, entretanto, as concentrações de nitrogênio foram mantidas. Os procedimentos para completar as soluções, aferir o pH ou qualquer outra manipulação foram realizados de modo que não houvesse movimento da solução, para que não ocorresse aeração do meio.

A capacidade de campo (CC) do substrato foi determinada a partir de três amostras de substrato areia, com peso de 250 gramas que foram secos em estufa de circulação forçada a 70°C, por 72 horas. Logo após, foi determinada a massa da areia seca e, em seguida, foi feita a saturação do substrato com água, permanecendo por mais 72 horas, para que o excesso de água fosse retirado, restando apenas a quantidade aderida às partículas da areia. A partir desses valores, foi determinado o valor de 0,21 m³.m⁻³ para o substrato utilizado.

Após esse cálculo, foram utilizadas duas lâminas d'água: o tratamento controle, com volume referente a 100% CC (1000mL) e o tratamento simulando o déficit hídrico, com volume referente à 10% CC (100mL). No primeiro dia, todos os vasos foram irrigados à 100% da CC e, a partir daí, a disponibilidade de água resultante nos vasos era variável, por isso, os níveis de água foram medidos, semanalmente, para verificar a CC e completar cada vaso com seu valor correspondente de água ou solução nutritiva. Foram realizadas quatro medidas de umidade do substrato, ao longo do período experimental, utilizando o sensor de umidade ML2x *ThetaProbe* (Delta-tdevices).

Dessa maneira, foram estabelecidos nove tratamentos: 1.1) Plantas cultivadas na presença de nitrato irrigadas à 10% da capacidade de campo (NO_3^- DH), 1.2) a 100% da capacidade de campo (NO_3^- CC) e 1.3) alagadas (NO_3^- A); 2.1) Plantas cultivadas na presença de amônio irrigadas a 10% da capacidade de campo (NH_4^+ DH), 2.2) a 100% da capacidade de campo (NH_4^+ CC) e 2.3) alagadas (NH_4^+ A); 3.1) Plantas cultivadas na ausência de nitrogênio irrigadas a 10% da capacidade de campo (0N DH), 3.2) a 100% da capacidade de campo (0N CC) e 3.3) alagadas (0N A).

Sabe-se que o substrato areia não é indicado em experimentos que avaliam déficit hídrico em plantas, uma vez que a sua capacidade de retenção de água, quando comparada ao solo argiloso, é bem reduzida. Porém, esse tipo de substrato foi utilizado, nesse estudo, porque permite um maior controle dos níveis de nitrogênio avaliados.

Para verificar o efeito da duração dos estresses, após 7, 14 e 21 dias da indução dos tratamentos, quatro plantas por tratamento, foram selecionadas aleatoriamente para as avaliações biofísicas e bioquímicas. As soluções foram aplicadas em intervalos de sete dias, sempre no dia anterior às coletas.

Tabela 1. Composição da solução nutritiva de Bolle-Jones (1957) em função dos diferentes tratamentos utilizados no experimento. UFLA, Lavras, MG.

Sal	Solução Estoque (SE)	Proporção de nitrato e amônio (mM)		
		0/0	8/0	0/8
		Volume da SE		
Macronutrientes	(M)	mL.L ⁻¹		
Ca(NO ₃) ₂	0,5	-	6,0	-
KNO ₃	0,5	-	4,0	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	-	-	6,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	-	-	2,0
CaSO ₄	0,01	150	-	150
KCl	0,5	2,0	-	4,0
MgSO ₄	0,5	2,5	5,0	2,0
NaH ₂ PO ₄	0,5	2,0	2,0	-
K ₂ SO ₄	0,5	2,0	1,0	1,0
CaCl ₂	0,5	-	-	-
Na ₂ SO ₄	0,5	-	-	1,0
NH ₄ NO ₃	0,5	-	-	-
Micronutrientes	mmol.L ⁻¹			
H ₃ BO ₃	25	1,0	1,0	1,0
CuSO ₄	0,5	1,0	1,0	1,0
Fé-EDTA	20	1,0	1,0	1,0
H ₂ MoO ₄	0,5	1,0	1,0	1,0
MnSO ₄	2	1,0	1,0	1,0
ZnSO ₄	2	1,0	1,0	1,0
Elemento	Concentração total (mg.L ⁻¹)			
N	0	112	112	
P	31	31	31	
K	117	117	117	
Ca	60	120	60	
Mg	30	60	24	
S	120	96	198	

2.1. Características avaliadas

2.1.1. Trocas Gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas entre 9 e 11 horas da manhã, utilizando um analisador de gás infravermelho IRGA (Infra red Gas Analyzer, LI6400, Licor). Foi utilizada uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (DFFFA) de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, semelhante a que as plantas foram crescidas. A taxa assimilatória líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a taxa transpiratória (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram determinadas.

O potencial hídrico foliar não foi avaliado, neste trabalho, em razão da quantidade limitada de folhas, porém, através dos parâmetros de trocas gasosas (g_s e E) pode-se inferir o status hídrico da folha.

2.1.2. Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas e no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas. Folhas novas completamente expandidas e as raízes, após serem separadas da parte aérea e lavadas, foram coletadas, pesadas, acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em ultrafreezer a -80°C para as posteriores análises.

As quantificações das atividades das enzimas do metabolismo do nitrogênio avaliadas, seguiram os protocolos de rotina do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas da UFLA.

À análise da redutase do nitrato, empregou-se o método *in vivo* e a obtenção dos extratos e o ensaio enzimático da sintetase da glutamina (GS), glutamato sintase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH), foram realizados da seguinte forma: o material vegetal utilizado foi composto de 0,5 gramas de

lâminas foliares ou raízes laterais previamente lavadas em água destilada, sendo imediatamente colocadas em papel alumínio e congeladas em ultrafreezer.

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela maceração de 0,5 gramas de tecido em graal com N₂ líquido, em 5mL de um meio composto por tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5, 10% de polivilpolipirrolidona (PVPP), ditioneitol (DTT) 2 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1M. Após centrifugação a 13000 g por 20' a 4°C, o sobrenadante foi acondicionado em eppendorfs e mantidos sob refrigeração.

O ensaio das enzimas GS, NADH-GOGAT e GDH foi realizado segundo Delú- Filho et al. (1998), Shan et al. (2012) e Carvalho (2012). O produto da reação da GS, o quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA), foi determinado em espectrofotômetro a 540nm e a atividade enzimática expressa em $\mu\text{mol de GHA.g}^{-1} \text{MF.min}^{-1}$. A atividade da NADH-GOGAT foi determinada pelo decréscimo na concentração do NADH avaliado a 340 nm, o ensaio da desidrogenase do glutamato (GDH) também foi monitorado pela oxidação do NADH a 340 nm.

Para a quantificação das atividades das enzimas do metabolismo antioxidante avaliadas, foram utilizados os protocolos de rotina do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas da UFLA. Aproximadamente, 200 mg de lâmina foliar e tecido radicular foram macerados, separadamente, em N₂ líquido acrescido de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) insolúvel, para que não houvesse oxidação e, homogeneizados em 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 e armazenado em ultrafreezer para posteriores análises das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX).

A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima feito da seguinte maneira: % DE INIBIÇÃO = (A560 amostra com extrato enzimático – A560 controle sem enzima) / (A560 controle sem enzima). Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da CAT foi determinada conforme Havir e McHale (1987). A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da APX foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), por meio do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.1.3. Quantificação de Nitrato e Aminoácidos na seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi obtida por meio da metodologia adaptada de Scholander et al. (1964), Milburn e Ranasinghe (1996), Stoermer et al. (1997) e Diniz (2011). Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer para a realização das análises posteriormente.

A determinação do nitrato foi realizada seguindo a metodologia proposta por Cataldo et al. (1975). Nos tubos de ensaio foram pipetados 100 μL da amostra (seiva) e 400 μL do reagente salicílico (ácido salicílico 5% p/v em H_2SO_4 concentrado) agitando-se cada tubo. Decorridos 20 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente 9,5mL de NaOH 2N. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e medidas as absorvâncias a 410nm.

A quantificação dos aminoácidos foi realizada no Laboratório de Pedologia e Geoquímica Ambiental do departamento de Ciências do Solo da UFLA.

Os padrões externos para padrões de aminoácidos livres foram adquiridos da Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) contendo (alanina, arginina, aspartato, cistina, ácido glutâmico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina e valina), acrescido de GABA (ácido γ aminobutírico) e triptofano da Sigma-Aldrich. Para a validação do método de quantificação, recuperação dos aminoácidos e qualidade das análises químicas utilizou-se a norvalina (ácido 2-aminopentanóico) da Sigma-Aldrich como padrão interno. Preparou-se uma solução estoque de aminoácidos na concentração de 1 $\mu\text{mol/mL}$, e as concentrações da curva padrão foram (0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; e 1 $\mu\text{mol/mL}$). A detecção dos aminoácidos foi obtida com a derivação automatizada, usando o orto-ftaldialdeído (OPA) e analisado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa, de acordo com as instruções descritas pela Agilent. As amostras filtradas da seiva do xilema foram determinadas, usando uma coluna analítica Zorbax Eclipse AAA (150 x 4.6 mm x 5 μm) e a análise foi monitorada a 338nm com a coluna a 40°C. A fase móvel foi preparada por meio de um gradiente, a partir da mistura de 40 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (solvente A, pH 7.8) e ACN:MeOH:água (45:45:10, v/v/v) (solvente B). A taxa de fluxo foi configurada a 2mL/min e o volume de injeção de 20 μL . O gradiente foi programado para um total de 30 minutos e a quantificação dos diferentes compostos foi baseada nas áreas dos picos e calculado como equivalentes de compostos padrões representativos. Todos os conteúdos foram expressos em miligramas por mL de seiva. Cada resultado mostrado nas figuras é a média de três repetições por tratamentos.

2.2. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3x3), composto por três condições ambientais de substrato (CC, BDA e BDO) e três fontes de nitrogênio (NO_3^- , NH_4^+ e 0N) com 4 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo utilizado o teste de Scott-Knott para a comparação de médias entre os tratamentos (a apresentação e discussão dos resultados foram subsidiados pela análise estatística que não foi apresentada nos gráficos). Para a plotagem das figuras foi utilizado o programa Sigma Plot, versão 11.0.

3 RESULTADOS

3.1. Trocas Gasosas

As fontes nitrogenadas favoreceram a taxa assimilatória líquida de CO_2 (A) (Fig.1). Sob baixa disponibilidade de água (BDA), A , condutância estomática (g_s) e taxa transpiratória (E) (Fig.2 A e B) foram fortemente diminuídas, a partir do 14º dia de avaliação em todos os tratamentos, independente de presença ou ausência de N no substrato. Nessa condição hídrica, as plantas cultivadas na presença de NH_4^+ apresentaram menor g_s e E (Fig.2A e B).

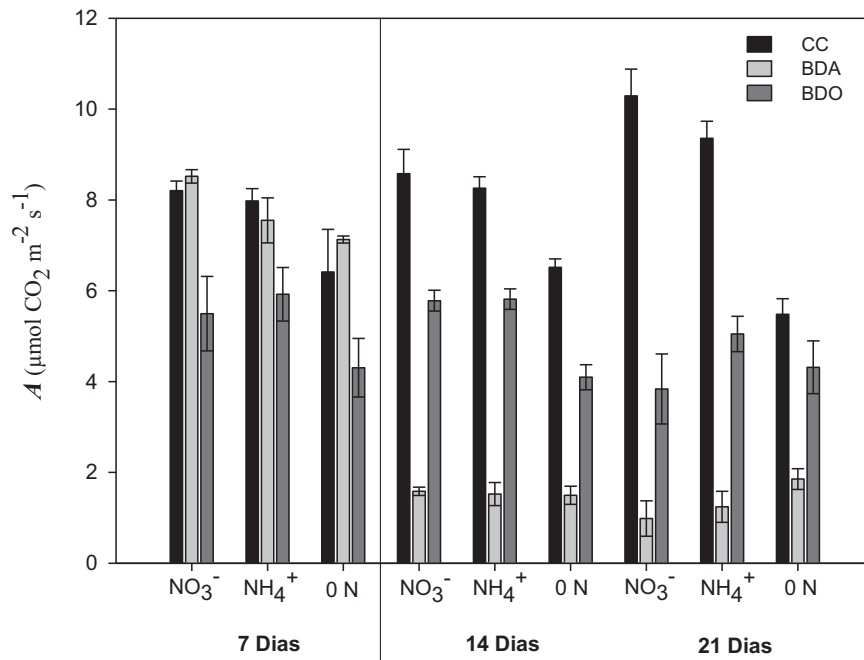


Figura 1 Taxa assimilatória líquida de CO₂ (*A*) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO₃⁻, NH₄⁺ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representam média \pm desvio padrão de quatro repetições.

Sob baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) a *gs* também foi diminuída a partir do 14º de avaliação (Fig.2A). No geral, plantas cultivadas com nitrato apresentaram maiores valores de *E*.

As plantas cultivadas na ausência de N apresentaram as menores taxas de *A*, *gs* e *E*.

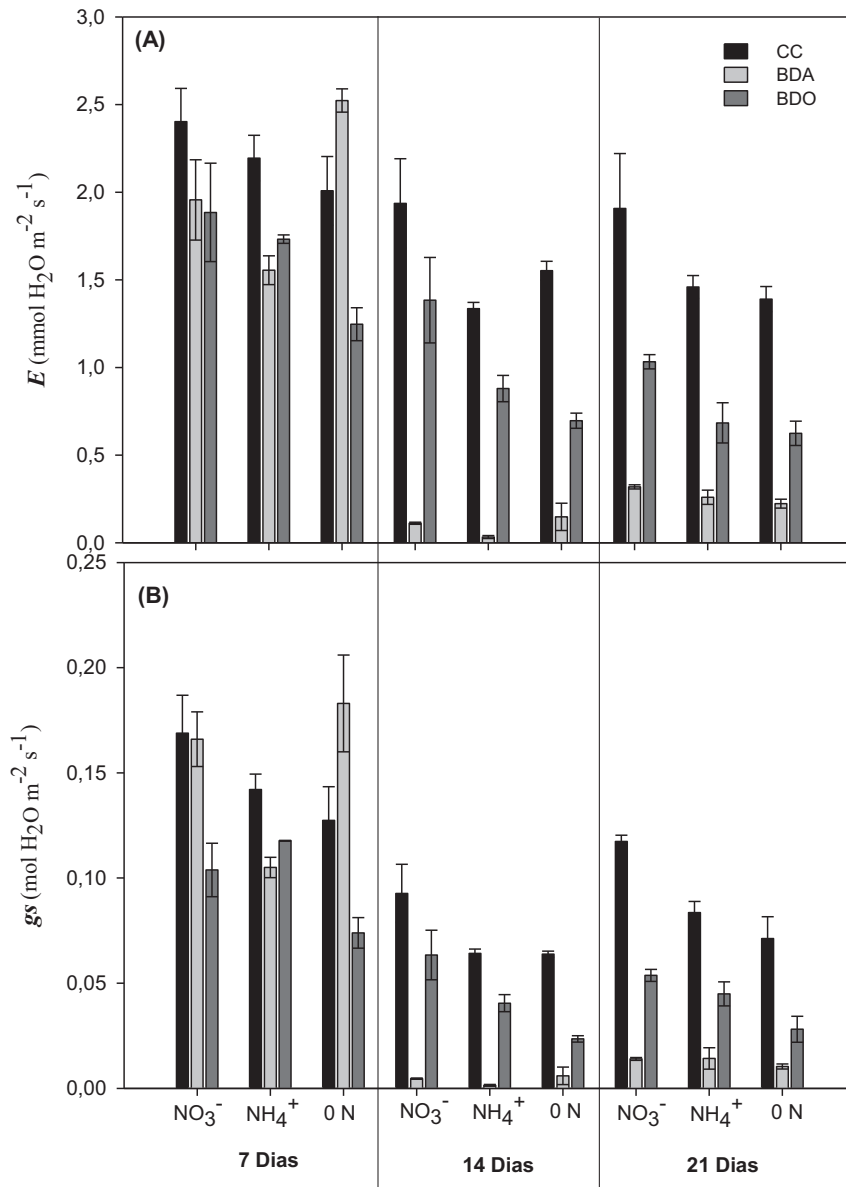


Figura 2 Condutância estomática (g_s) (A) e taxa transpiratória (E) (B) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representam média \pm desvio padrão de quatro repetições.

3.2. Enzimas do Metabolismo do Nitrogênio

A atividade da enzima glutamina sintetase (GS) foi maior em relação à glutamato desidrogenase (GDH) em folhas (Fig.3 A e B). Aos 21 dias, a atividade da GDH foi praticamente inibida em todos os tratamentos, enquanto a GS aumentou sua atividade, principalmente nas plantas sob BDA. Nas raízes, a atividade da GS também foi superior à da GDH. Glutamato sintase (NADH-GOGAT) e GDH não apresentaram diferença entre os tratamentos (Fig. 4 A, B e C).

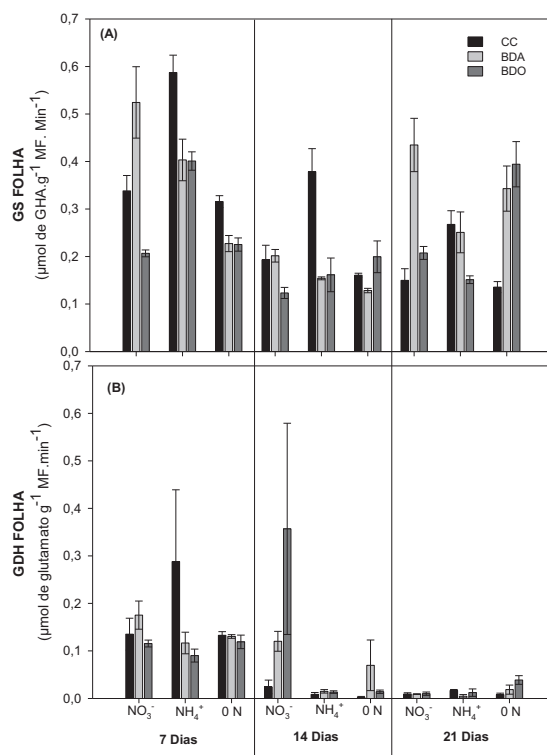


Figura 3 Atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) (A) e glutamato desidrogenase (GDH) (B) em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse.

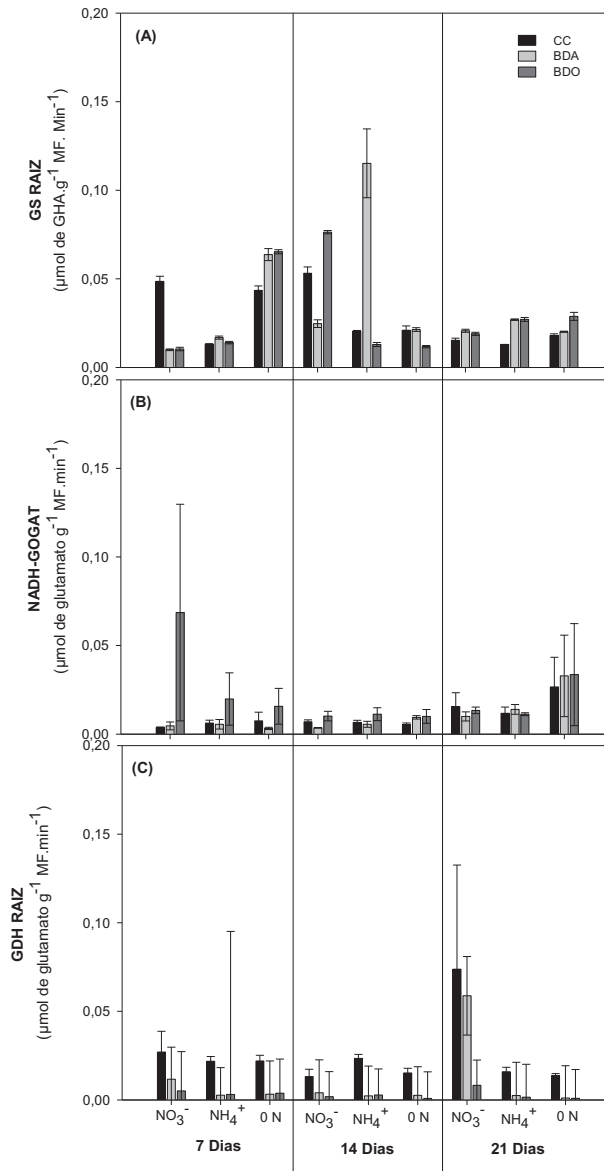


Figura 4 Atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) (A), glutamato sintetase (NADH-GOGAT) (B) e glutamato desidrogenase (GDH) (C) em raízes de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- , NH_4^+ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representam média \pm desvio padrão de quatro repetições.

3.3. Nitrato na seiva do xilema

O transporte de NO_3^- na seiva do xilema foi verificado apenas nas plantas tratadas com esse ânion (Fig.5). As plantas sob BDO apresentaram alto teor de nitrato sendo transportado na seiva do xilema, aos 14 dias após imposição do estresse.

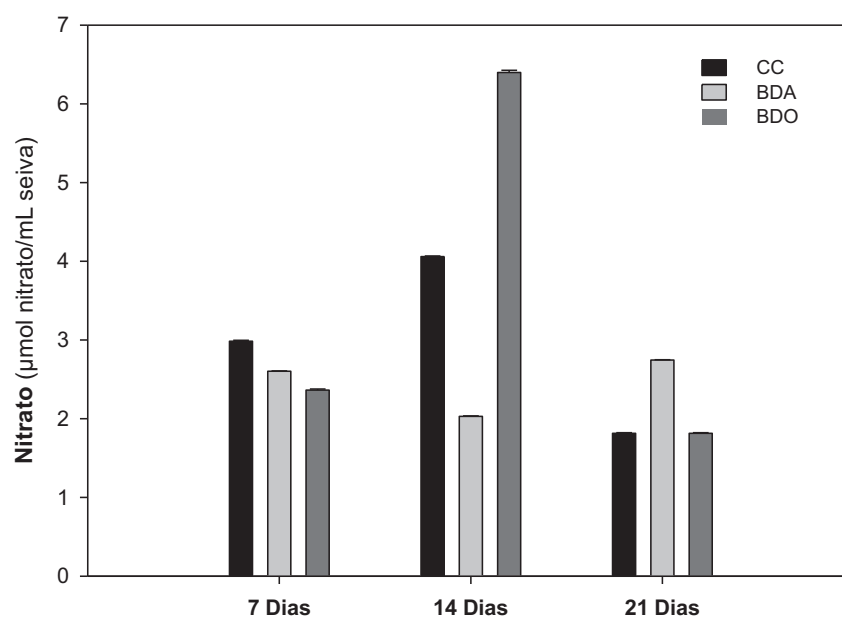


Figura 5 Teor de nitrato na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO_3^- em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representam média \pm desvio padrão de quatro repetições.

3.4. Aminoácidos translocados na seiva do xilema

Os principais aminoácidos transportados na seiva do xilema foram: Ácido γ -aminobutírico (GABA) (Fig.6), Asparagina + Aspartato (ASX) e Glutamina + Glutamato (GLX) (Fig. 7), Alanina (ALA), Arginina (ARG) e Serina (SER) (Fig.8). Na figura 9, mostra-se a soma dos outros aminoácidos encontrados na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira.

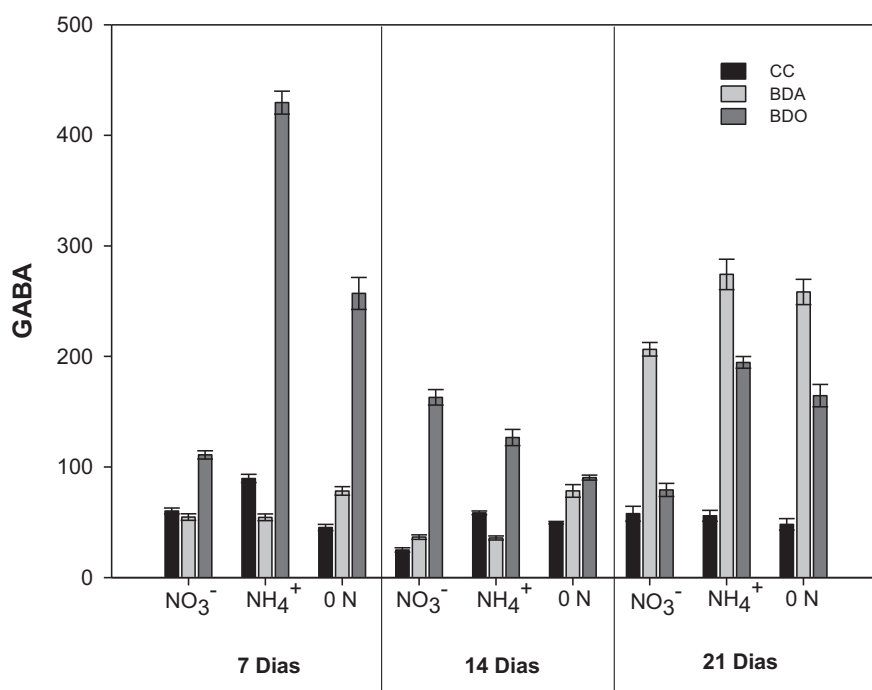


Figura 6 Ácido γ -aminobutírico (GABA) translocado na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO₃⁻, NH₄⁺ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse.

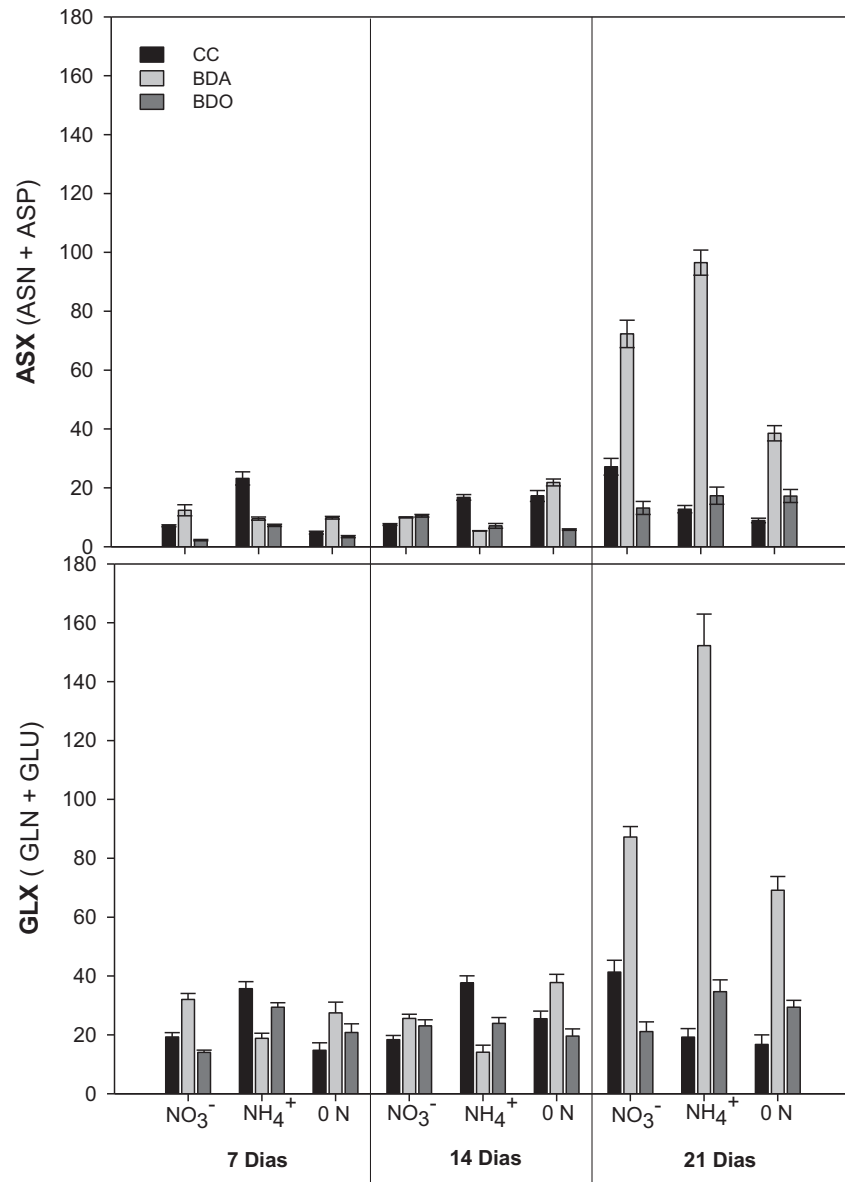


Figura 7 Asparagina + Aspartato (ASX) e Glutamina + Glutamato (GLX) translocados na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO₃⁻, NH₄⁺ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse.

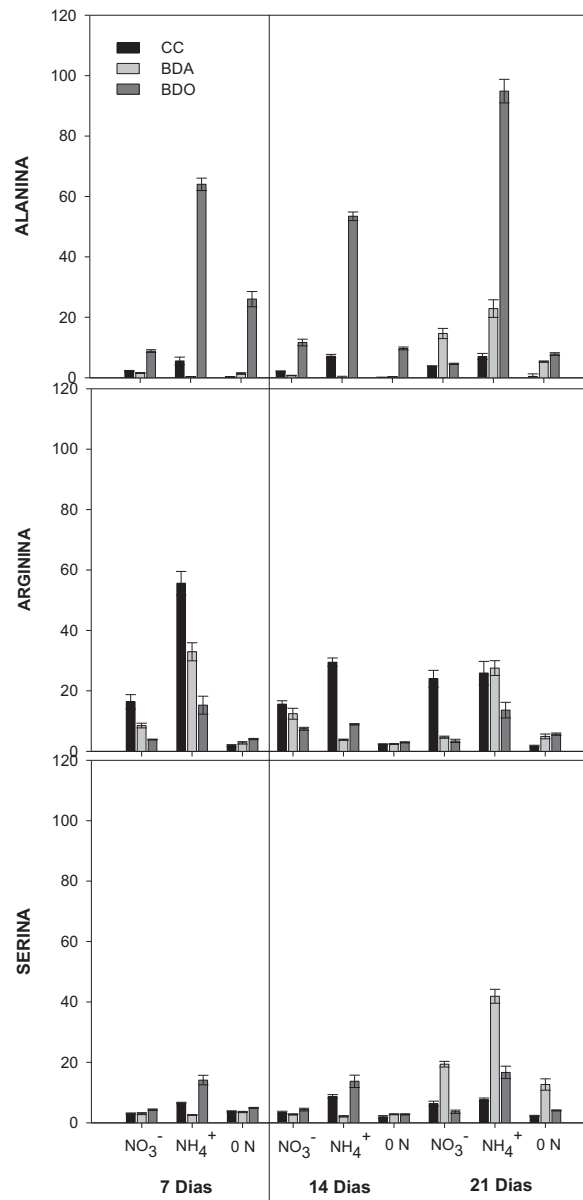


Figura 8 Alanina, Arginina e Serina translocados na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO₃⁻, NH₄⁺ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse.

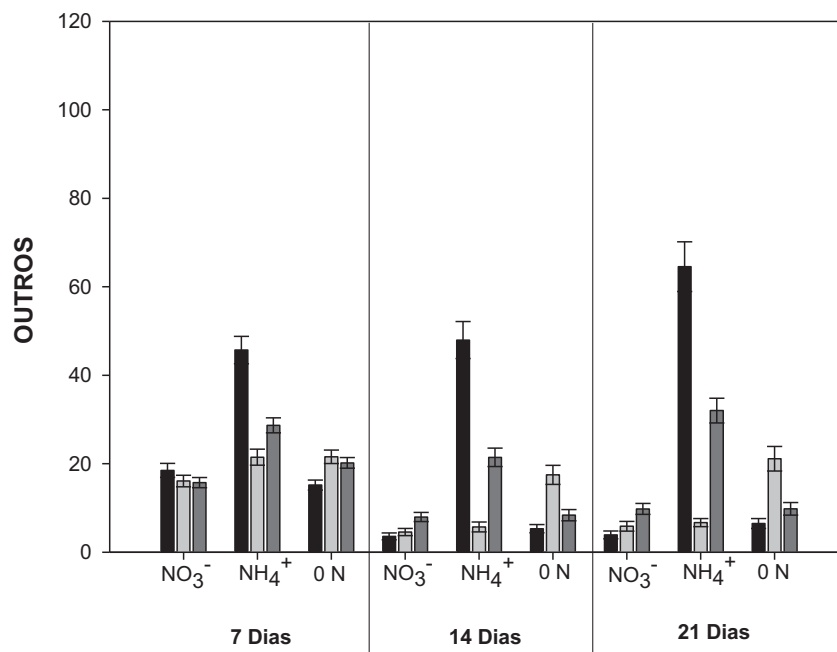


Figura 9 Somatório dos outros aminoácidos translocados na seiva do xilema (em mg/mL) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO₃⁻, NH₄⁺ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Outros incluem: Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano, Tirosina e Valina.

O resultado mais notável foi a indução de um aumento muito expressivo no conteúdo de alanina e GABA pela deficiência de O₂ nas plantas cultivadas com amônio e na ausência do nitrogênio. A BDA promoveu aumento significativo de ASX, GLX e GABA, após 21 dias da indução do estresse.

Na soma dos aminoácidos Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano e Tirosina, as plantas cultivadas com amônio, principalmente sob BDO, apresentaram maior concentração na seiva do xilema.

3.5. Enzimas do Metabolismo Antioxidante

As fontes nitrogenadas (NO_3^- e NH_4^+) favoreceram as atividades das enzimas SOD e CAT nas lâminas foliares no primeiro dia avaliado (7 Dias) (Fig. 10 A e B). A atividade da SOD nas plantas cultivadas com NO_3^- apresentaram o mesmo comportamento, independentemente do status hídrico e as cultivadas com NH_4^+ sob BDO apresentaram menor atividade. No decorrer dos dias, a atividade da CAT foi diminuída e nas plantas sob BDO essa queda foi mais pronunciada. Plantas cultivadas sem nitrogênio apresentaram as menores atividades da CAT nas folhas.

Nas raízes, plantas sob BDO apresentaram maiores atividades da SOD e CAT. As plantas cultivadas com NO_3^- sob BDO tiveram atividade da SOD crescente, e as adubadas com NH_4^+ apresentaram maior atividade da CAT, sete dias após a imposição do estresse. Sob BDA as plantas adubadas com NH_4^+ apresentaram maior atividade da SOD.

A atividade da APX em folhas e raízes de seringueira não foi detectada.

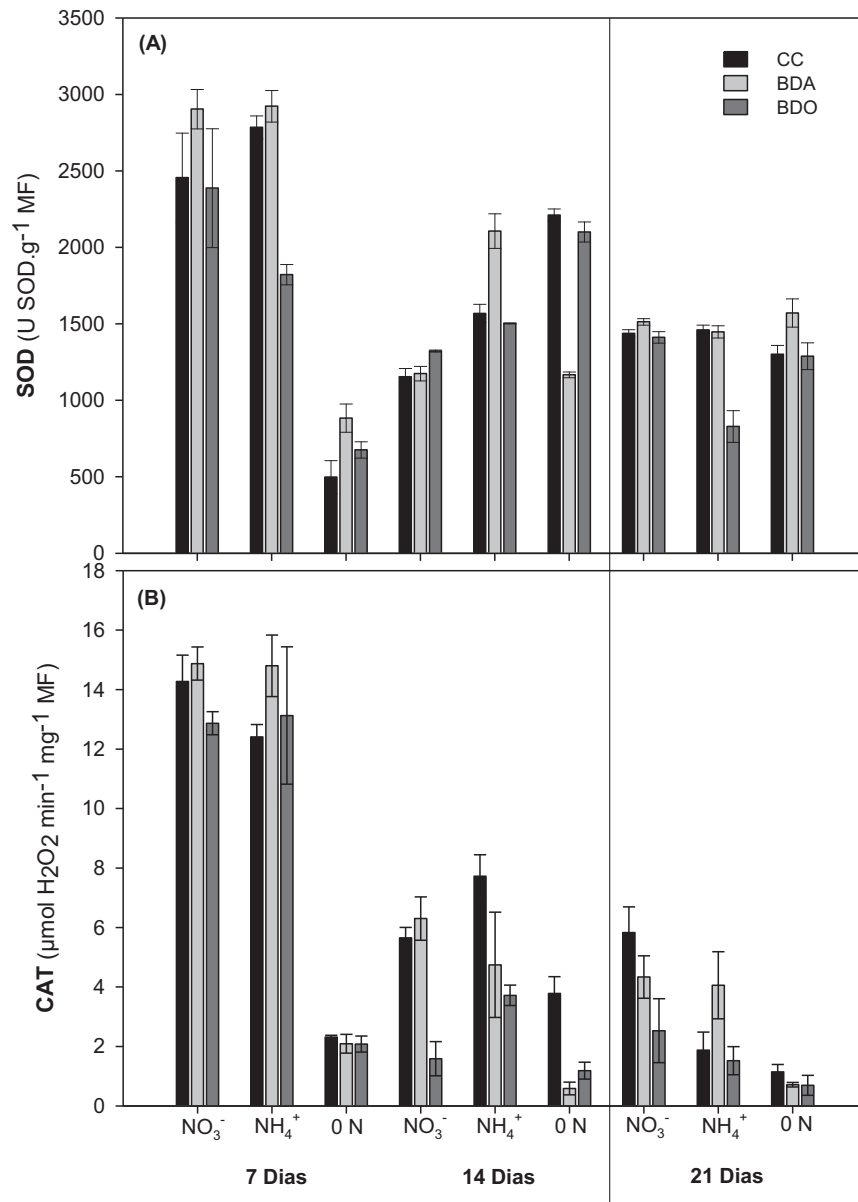


Figura 10 Atividades das enzimas antioxidantes SOD (A) e CAT (B) em folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO₃⁻, NH₄⁺ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representam média ± desvio padrão de quatro repetições.

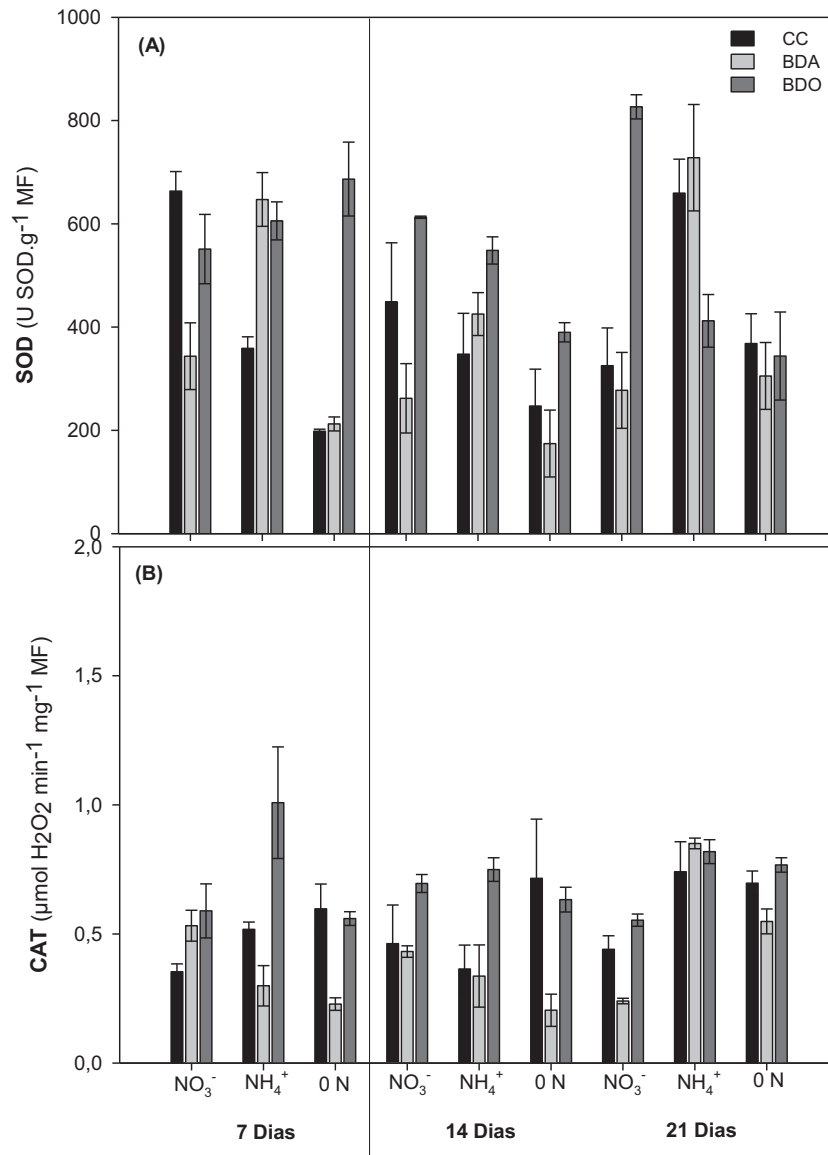


Figura 11 Atividades das enzimas antioxidantes, SOD (A) e CAT (B) em raízes de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de NO₃⁻, NH₄⁺ e na ausência de N em três condições hídricas: capacidade de campo (CC), baixa disponibilidade de água (BDA) e baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a indução do estresse. Barras representam média ± desvio padrão de quatro repetições.

4 DISCUSSÃO

Plantas jovens de seringueira mantêm suas atividades fotossintéticas em condições adequadas até sete dias após exposição aos estresses (BDA e BDO). Depois desse tempo, a deficiência de água afeta profundamente o metabolismo dessas plantas independente de presença ou ausência de fonte nitrogenada no substrato, verificado pela redução da taxa assimilatória líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e taxa transpiratória (E) (Fig. 1 e 2).

A diminuição de g_s e E justifica a queda das taxas de A . Esse fato indica fechamento estomático como estratégia de defesa, que minimiza a perda de água pela transpiração e ajuda a manter o elevado teor hídrico nas folhas. O declínio desses parâmetros caracteriza efeito protetor, o que permite à planta economizar e melhorar a eficiência do uso da água (EUA) (CHAVES et al., 2009). O aumento da EUA é uma estratégia adotada pelas plantas em condições de déficit hídrico para minimizar as perdas de água, por meio do controle da abertura dos estômatos. Segundo Conforto (2008), plantas jovens de seringueira do clone RRIM 600 e GT1 sob baixa disponibilidade hídrica cessam a taxa assimilatória líquida de CO_2 em 17 e 20 dias, respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Na primeira semana avaliada, as taxas fotossintéticas das plantas cultivadas em deficiência de O_2 no substrato foram menores quando comparadas às plantas sob BDA e CC (Fig.1), isso mostra que o alagamento tem forte impacto nos primeiros dias de estresse, porém, no decorrer do tempo, os valores de A mantiveram-se estáveis, diferentes das plantas sob deficiência hídrica que diminuiram bruscamente. O decréscimo da g_s é também uma resposta comum ao alagamento promovido pelo fechamento estomático (KOZLOWSKI, 1997). A hipoxia leva ao aumento da acidez nas células das raízes e consequente diminuição do pH. Esse fato implica na inibição da atividade das aquaporinas,

proteínas de membrana presentes nas células vegetais que facilitam o transporte de água, e na conseqüente diminuição da permeabilidade e da condutividade hidráulica das raízes que inibe a absorção de água, levando a planta a uma condição de déficit hídrico (TOURNAIRE-ROUZ et al., 2003; MAUREL et al., 2008). A redução em E de plantas submetidas ao alagamento, também ocorre em razão da diminuição na g_s .

Mais uma vez, a importância do nitrogênio na manutenção de elevadas taxas de assimilação de carbono em plantas de seringueira foi demonstrada. O aumento do tempo de exposição à fonte nitrogenada altera, positivamente, a atividade fotossintética de plantas bem irrigadas (CC), verificadas pelo aumento de A , diferente daquelas cultivadas na ausência de nitrogênio, o que reforça a necessidade do N na composição das clorofilas e complexos enzimáticos e não enzimáticos, importantes para o metabolismo vegetal. Porém, é interessante observar que as maiores taxas de A obtidas nas plantas alagadas cultivadas na presença de N são similares à das plantas controle cultivadas na ausência de nitrogênio (0N CC). Esse fato mostra que plantas jovens de seringueira bem hidratadas cultivadas na ausência de nitrogênio (deficiência) apresentam comportamento fotossintético igual ao de uma planta alagada. Tal situação mostra que sob estresse, as respostas de trocas gasosas são mais influenciadas pelo fator “água” do que pela presença ou ausência de fonte nitrogenada.

A atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio parece não sofrer muita alteração quanto ao tipo de estresse e fontes nitrogenadas. Foi observado um ligeiro aumento da glutamina sintetase (GS) foliar das plantas cultivadas com NH_4^+ e a maior atividade dessa enzima em relação à glutamato desidrogenase (GDH) nesse órgão (Fig.3). A atividade da GS nas lâminas foliares de seringueira depende de outra fonte de amônio, pois em decorrência da ausência da redutase do nitrato (RN) nas folhas, não detectada até o momento (DELÚ-FILHO; OLIVEIRA; ALVES, 1997; LEMOS et al., 1999; SHAN et al., 2012) e

confirmada neste trabalho, e à concentração muito baixa de NH_4^+ transportado na seiva (DINIZ, 2011; CARVALHO, 2012), essa enzima não utiliza o N absorvido pelas raízes na forma de NO_3^- e diretamente transportado à parte aérea pelo xilema. Esse resultado indica que o NH_4^+ utilizado pela GS pode ser decorrente da fotorrespiração, da ação da asparaginase ou da proteólise (LEA; ROBINSON; STEWART, 1990). A degradação de proteínas e aminoácidos também pode explicar o aumento da GS nas folhas das plantas cultivadas sob estresse (BDA e BDO), no final do experimento. Nesse mesmo período, foi observado decréscimo da atividade da enzima GDH nas folhas, o que pode corresponder a uma inibição dessa enzima provocado pelo estresse (Fig.3). Nesse cenário, os presentes resultados, apoiam o papel da GS na assimilação de nitrogênio, mesmo sob condições adversas de ambiente, em detrimento da GDH, comprovando que essa enzima é mais efetiva no sentido de desaminação (TERCÉ-LAFORGUE et al., 2013).

Nas plantas controle, a atividade da GS foliar foi menor naquelas cultivadas na presença de nitrato, quando comparada às cultivadas na presença de amônio. Além disso, a absorção e o transporte do NO_3^- ocorreu mesmo sob estresse, observado pelo aumento de nitrato na seiva do xilema, principalmente, aos 14 dias de imposição do estresse nas plantas controle e alagadas (Fig.5). Nessa avaliação, a atividade da GS foi diminuída nessas plantas. De forma interessante, esses resultados reforçam a hipótese da ausência e/ou inibição da RN nas lâminas foliares de seringueira.

O nitrato transportado através da seiva do xilema pode ter sido armazenado nos vacúolos, já que esse íon é mais facilmente distribuído por toda a planta em comparação ao NH_4^+ (DECHORGNAT et al., 2011) e pode ser acumulado nos vacúolos de raízes e parte aérea de onde ele pode ser recuperado facilmente (LI; WANG; STEWAR, 2013). Além disso, quando a síntese de carboidratos é diminuída e as substâncias orgânicas no vacúolo também são

diminuídas, o nitrato pode desempenhar um papel na regulação osmótica (LI; WANG; STEWAR, 2013). Esse mecanismo de regulação pode ser um dos principais fatores para o melhor funcionamento das plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato e contribuir para a melhor tolerância dessas plantas frente às condições adversas. Entretanto, mais estudos serão necessários para a melhor compreensão dessa estratégia, especialmente em plantas sob BDA e, também, para certificar o verdadeiro papel do nitrato transportado para parte aérea de plantas jovens de seringueira, uma vez que “não” pode ser metabolizado nas folhas.

Nas raízes, também não foi detectada a atividade da redutase do nitrato e a atividade da GDH foi fortemente diminuída nas plantas sob estresse (Fig.4). Para a atividade da NADH-GOGAT não houve variação entre os tratamentos. Quando comparada as atividades enzimáticas da GS com a NADH-GOGAT nas raízes, mostra que houve formação de glutamina, comprovada pelo transporte de aminoácidos na seiva do xilema, por meio dos valores de GLX.

A análise geral do conteúdo de aminoácidos endógenos indica que a hipoxia levou ao redirecionamento do metabolismo de aminoácidos, particularmente para alanina e síntese de GABA, principalmente em plantas cultivadas com amônio e desprovidas de N, e o déficit hídrico ao aumento da síntese de ASX (asparagina + glutamina), GLX (glutamina + glutamato) e mais uma vez do GABA, que apresentaram maior acúmulo nessa situação (Fig. 6, 7 e 8). No geral, o NH_4^+ promoveu uma alta incorporação de N em aminoácidos, o que já era esperado, já que a assimilação do amônio em aminoácidos é mais barata em termos energéticos. Para a redução e assimilação de NO_3^- , grandes quantidades de energia e esqueletos de carbono são necessárias em relação ao NH_4^+ (LI; WANG; STEWAR, 2013).

Os resultados encontrados neste trabalho, quanto ao padrão de translocação de aminoácidos no xilema, estão de acordo com Alves (2001) que

encontrou glutamina e a arginina, independente da fonte de N utilizada e com Diniz (2011) que, estudando bactérias diazotróficas associadas a plantas jovens de seringueira e sua influência sobre o metabolismo do nitrogênio encontrou glutamina, GABA, aspartato, arginina, glutamato, alanina e serina como os principais transportados nas plantas controle suplementadas com 8mM de N (5mM NO₃⁻/ 3mM NH₄⁺).

Em plantas, o GABA é conhecido por se acumular em condições de estresses, entretanto, a consequência desse acúmulo em tecidos vegetais é, ainda, pouco entendida. Foi verificado que os níveis de GABA são muito elevados sob condições anaeróbicas (CRAWFORD et al., 1994; OLIVEIRA; SODEK, 2013) e de seca (RAGGI, 1994; THOMPSON; STEWART; MORRIS, 1966). A alanina, assim como o GABA, surge em maiores proporções, quando organismos aeróbicos são privados de O₂, sendo a fosforilação oxidativa mitocondrial inibida, enquanto as vias da glicólise e fermentação são promovidas, levando a um acúmulo desses aminoácidos (FAN et al., 1997). Um papel do GABA foi proposto na tolerância à deficiência de O₂, uma vez que o seu catabolismo para γ -hidroxibutirato contribui para regeneração do NAD⁺ em condições de hipoxia (BREITKREUZ et al., 2003), enquanto que a síntese de GABA, através da glutamato descarboxilase (GAD), consome H⁺, contrabalanceando, assim, os efeitos prejudiciais da acidificação citosólica durante hipoxia (CRAWFORD et al., 1994). O envolvimento de alanina na regulação do pH citosólico em condições de hipoxia também tem sido sugerido e o aumento no conteúdo total de aminoácidos em plantas sob estresse tem sido associado a efeito protetor da viabilidade celular (SHINGAKI-WELLS et al., 2011).

Em plantas superiores, também ocorre acúmulo de GABA e prolina como respostas fisiológicas típicas ao déficit hídrico (LIU; ZHAO; YU, 2011). O GABA pode funcionar como um osmoprotetor e mitigar o efeito do estresse (SHELP; BOWN; MCLEAN, 1999) e o acúmulo desse aminoácido nas células

pode equilibrar a diminuição do potencial hídrico que ocorre durante a desidratação celular (KINNERSLEY; TURANO, 2000). Nas plantas cultivadas na ausência de N, a diminuição do teor de arginina pode indicar que o aumento da produção do GABA seja proveniente do metabolismo das poliaminas, conforme sugerido por Diniz (2011). Esses resultados sugerem o que tem sido encontrado em outras espécies, que o GABA pode ser um sinalizador de estresse responsável pela ativação de mecanismos fisiológicos em plantas jovens de seringueira, mas o seu papel na tolerância ao estresse hídrico dessa espécie precisa ser melhor compreendido.

Das enzimas avaliadas, a SOD e a CAT foram as principais responsáveis pela limpeza das EROs neste estudo. Os resultados mostram, mais uma vez, que plantas jovens de seringueira apresentam suas atividades fisiológicas normais até sete dias após a imposição do estresse e, após esse período, o metabolismo da planta passa a ser mais fortemente comprometido. O acúmulo do GABA nesse momento pode ser indicador de estresse severo. O aumento da atividade das enzimas SOD e CAT nas lâminas foliares das plantas cultivadas na presença de N, uma semana após a imposição do estresse, demonstra que houve estresse oxidativo, mas as plantas foram capazes de atuar na detoxificação das EROs, porém com a diminuição da CAT no decorrer dos dias, principalmente nas plantas deficientes de O₂, o estresse foi mais severo e o sistema de defesa dessas plantas foi ineficaz para controlar o estresse oxidativo. As plantas tratadas sem fonte de nitrogênio, mostraram as menores taxas, em razão da carência desse elemento essencial à formação das enzimas. Nesse caso, as plantas sofreram duplo estresse, além do alagamento e falta d'água, a deficiência de N pode ter sido fator chave nessa resposta. Nas raízes, o alagamento favoreceu o aumento da atividade da SOD e CAT. Esse fato também pode ser correlacionado a aumento do GABA nessas plantas. Esses resultados são contrastantes àqueles encontrados por Carvalho (2012) em plantas de seringueira alagadas, uma vez que não foi

verificada atividade das enzimas antioxidantes nas raízes, e nas folhas os resultados foram similares apenas para a CAT nas plantas cultivadas sem fonte nitrogenada. Esse fato pode ser decorrente da origem das sementes (material genético), da diferença de clones e também da idade das plantas.

Os principais mecanismos de eliminação das EROs agem conjuntamente e incluem um sistema enzimático extremamente eficiente, composto pelo superóxido dismutase (SOD), enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, a exemplo da ascorbato peroxidase (APX), e catalase (CAT). A SOD é a primeira linha de defesa, no ataque às EROs, e, rapidamente, elimina o superóxido, uma das primeiras EROs formadas, gerando oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou seja, a SOD apenas converte uma espécie reativa em outra, logo, o H_2O_2 também precisa ser eliminado, para evitar danos à célula. Nesse caso, a CAT e APX são as principais enzimas responsáveis pela quebra dessa molécula, porém elas apresentam afinidades diferentes para o H_2O_2 e parecem ter diferentes funções celulares nesse processo. Enquanto a CAT tem afinidade mais baixa para o H_2O_2 e está localizada, exclusivamente, nos peroxissomos, a APX tem alta afinidade, e está localizada em vários compartimentos celulares. Dessa maneira, a CAT remove o excesso de produção de EROs, atuando quando o estresse é mais severo, ao contrário da APX que elimina o H_2O_2 quando em baixas concentrações, sendo utilizada para fins de sinalização (WILLEKENS et al., 1997; NOCTOR; FOYER, 1998). Diante disso, observa-se que o aumento da CAT pode ser decorrente do estresse severo acometido nessas plantas e também decorrente do processo fotorrespiratório.

As plantas cultivadas com NH_4^+ e na ausência de N apresentaram comportamentos semelhantes quanto às trocas gasosas e composição de alguns aminoácidos (GABA e GLX) na seiva, no final do experimento. Esse fato, mais uma vez constata que o cultivo com nitrato favorece o melhor funcionamento das plantas de seringueira em condições normais e também sob estresse. A eficácia

das plantas cultivadas com NO_3^- pode ser comprovada, por meio do melhor desempenho fotossintético, além dos mecanismos de defesa vistos pelo aumento das enzimas antioxidantes e também pelo menor acúmulo de GABA na seiva do xilema, indicando que essas plantas apresentam melhores estratégias de sobrevivência e, provavelmente, de tolerância.

5 CONCLUSÃO

A influência do nitrogênio no funcionamento de plantas jovens de seringueira em condições normais e sob condições de BDA e BDO foi comprovada. Foi constatado também que o GABA é o principal aminoácido transportado das raízes para parte aérea sob condições de déficit hídrico e gasoso em plantas de seringueira.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos futuros poderão responder as dúvidas relacionadas ao metabolismo do N em plantas de seringueira, principalmente quando se trata da influência do NO_3^- e do NH_4^+ no desempenho metabólico dessa espécie em condições normais e sob condições adversas de ambiente.

Para isso, mais estudos são necessários visando a esclarecer a importância do NH_4^+ no processo fotorrespiratório, a ausência e/ou inibição da redutase do nitrato nas folhas, o papel do NO_3^- como agente osmótico e as formas de transporte de nitrogênio no floema. A utilização de isótopos estáveis (^{15}N) no desenvolvimento dessas pesquisas é de grande relevância para esclarecer essas questões. Deve ser considerado, também, estudos avaliando diferentes concentrações de Molibdênio na solução nutritiva, pois os níveis deste elemento, provavelmente, interferem na atividade da RN.

Além disso, estudos moleculares, avaliando a expressão de genes relacionados às aquaporinas com as fontes de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+), e a relação desses com a tolerância ao estresse hídrico são também necessários, pois já se sabe que os produtos da assimilação do N são requeridos para ativar as funções das aquaporinas e que as fontes nitrogenadas interferem de forma diferenciada na expressão de determinados genes. O estudo dos genes relacionados ao GABA e a Alanina são também necessários, a fim de se compreender o papel desses aminoácidos no funcionamento de plantas de seringueira cultivadas em condições normais e sob estresse.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- BOLLE-JONES, E. W. Cooper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 168-178, 1957.
- BOUCHÉ, N.; FROMM, H. GABA in plants: just a metabolite? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 3, p. 110–115, Mar. 2004.
- BRANDÃO, A. D.; SODEK, L. Nitrate uptake and metabolism by roots of soybean under oxygen deficiency. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 21, n. 1, p. 13–23, 2009.
- BREITKREUZ, K. E. et al. A novel c-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 42, p. 41552–41556, Oct. 2003.
- CARVALHO, P. A. et al. Compostos nitrogenados transportados na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira (*Hevea spp*) cultivadas com nitrato e/ou amônio e sob alagamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 14., 2013, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: [s.n], 2013. 1 CD ROM.
- CARVALHO, P. A. **Metabolismo do Nitrogênio e Antioxidante em plantas jovens de seringueira (*Hevea spp*) submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio e na presença de nitrato e/ou amônio**. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- 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**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- CHAVES, M. M. et al. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

CONFORTO, E. C. Respostas fisiológicas ao déficit hídrico em duas cultivares enxertadas de seringueira (“RRIM 600” e “GT 1”) crescidas em campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 679-684, 2008.

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

DECHORGNAT, J. et al. From the soil to the seeds, the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 1349–1359, Dec. 2011.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 21, p. 329-336, 1997.

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

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

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, June 1997.

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

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

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

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

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

KAR, R. K. Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 6, n. 11, p. 1741-1745, Nov. 2011.

KINNERSLEY, A. M.; TURANO, F. J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Clinford, v. 19, n. 6, p. 479-509, 2000.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 13-21, 1997.

LANZA, L. N. M.; ROSSI, S. C.; SODEK, L. Adubação nitrogenada beneficia soja alagada. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p.2-9, 2013.

LEA, P. J.; ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R. The enzymology and metabolismo glutamine, glutamate, and asparagine. In: MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. **Biochemistry of plants: intermediary nitrogen metabolism: volume 16**. New York: Academic Press, 1990. p. 121-159.

LEMOS, G. B. de et al. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 113-118, 1999.

LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWAR, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 118, p. 205-397, 2013.

LINKA, M.; WEBER, A. P. Shuffling ammonia between mitochondria and plastids during photorespiration. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, n. 10, p. 461-465, Oct. 2005.

LIU, C.; ZHAO, L.; YU, G. The dominant glutamic acid metabolic flux to produce γ -amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under

water stress relates to its significant role in antioxidant activity. **Journal of Integrative Plant Biology**, China, v. 53, n. 8, p. 608–618, Aug. 2011.

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

MAGALHÃES FILHO, J. R. et al. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira ‘Valência’ sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 75-82, 2008.

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

MAUREL, C. et al. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 595-624, 2008.

MILBURN, J. A.; RANASINGHE, M. S. A comparison of methods for studying pressure and solute potentials in xylem and also in phloem laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 294, p. 135-143, Jan. 1996.

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

NAVARI-IZZO, F. et al. Water stress induced changes in protein and free amino acids in field-grown maize and sunflower. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 28, n. 4, p. 531-537, 1990.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p. 249-79, June 1998.

OH, K.; KATO, T.; XU, H. L. Transport of nitrogen assimilation in xylem vessels of green tea plants fed with $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$. **Pedosphere**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 222-226, Apr. 2008.

OLIVEIRA, H. C.; SODEK, L. Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism of soybean root segments. **Amino Acids**, Wien, v. 44, n. 2, p. 743-755, Feb. 2013.

PARENT, C. et al. An overview of plant responses to soil waterlogging. **Plant Stress**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 20-27, Apr. 2008.

RAGGI, V. Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 3, p. 427–434, July 1994.

ROBERTS, M. R. Does GABA act as a signal in plants? **Plant Signaling & Behavior**, New York, v. 2, n. 5, p. 408-409, Sept./Oct. 2007.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E. et al. Ammonia production and assimilation: Its importance as a tolerance mechanism during moderate water deficit in tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 8, p. 816–823, May 2011.

SAWAZAKI, H. E.; SODEK, L.; TEIXEIRA, J. P. F. Transporte de compostos nitrogenados em soja cultivada com diferentes fontes de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 2, p. 291-302, 1987.

SCHOLANDER, P. F. et al. Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of the National Academy of Science**, Stanford, v. 52, n. 1, p. 119-125, July 1964.

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

SHELP, B. J.; BOWN, A. W.; MCLEAN, M. D. Metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 41, n. 11, p. 446–452, Nov. 1999.

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

STOERMER, H. et al. Nitrogen distribution in young Norway spruce (*Picea abies*) trees as affected by pedospheric nitrogen supply. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 4, p. 764–769, Dec. 1997.

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 & Cell Physiology**, Kyoto, v. 54, n. 10, p. 1635-1647, Oct. 2013.

TERCE-LAFORGUE, T.; GISELA, M.; HIREL, B. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants grown under different nitrogen regimes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, n. 2, p. 220-228, 2004.

THOMPSON, J. F.; STEWART, C. R.; MORRIS, C. J. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. I. The effect of water content of leaves and atmospheric oxygen level. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 41, n. 10, p.1578–1582, Dec. 1966.

TOURNAIRE-ROUX, C. et al. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. **Nature**, London, v. 425, n. 6956, p. 393–97, Sept. 2003.

WILLEKENS, H. et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 16, p. 1723-1732, Aug. 1997.