

Fotorrespiração e metabolismo antioxidante em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+)

Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro¹, Marcelo Pedrosa Gomes², Hugo Rafael Bentzen Santos¹, Michele Valquíria dos Reis¹, Ane Marcela das Chagas Mendonça¹, Luiz Edson Mota de Oliveira¹

¹ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia - Setor de Fisiologia Vegetal, Campus Universitário, CEP 37200-000, Lavras-MG, Brasil. Caixa Postal 37. E-mail: mariliamercia@yahoo.com.br, hugobentzen@hotmail.com; mvreis@yahoo.com.br; anemarcela@hotmail.com; ledson@dbi.ufla.br

² Université du Québec à Montréal, Succursale Centre-Ville 8888, H3C 3P8, Montréal, Canadá. E-mail: marcelopgom@yahoo.com.br

RESUMO

Neste estudo foram avaliados os efeitos do nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e da ausência de nitrogênio (N) na fotossíntese, no processo fotorrespiratório e no metabolismo antioxidante de plantas jovens de seringueira. As plantas foram cultivadas em areia, irrigadas com solução nutritiva de Bolle-Jones, com N na concentração de 8mM nas proporções $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0, 0/8 e 0/0. As trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, fotorrespiração e a atividade das enzimas antioxidantes em folhas (SOD, CAT e APX) foram mensuradas. A taxa assimilatória líquida de CO_2 (A) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) foram maiores nas plantas cultivadas com NO_3^- . Menor ETR e maior atividade fotorrespiratória foram observadas em plantas cultivadas na presença de NH_4^+ . A atividade da SOD foi maior nas plantas cultivadas na presença de N. Menor atividade da CAT e maior atividade da APX foram encontradas nas plantas cultivadas com NO_3^- . As plantas cultivadas na ausência de N apresentaram os menores valores de A. Portanto, verificou-se que as diferentes fontes de N afetaram significativamente o processo fotossintético em plantas de seringueira e o cultivo na presença de NH_4^+ favoreceu a fotorrespiração nessas plantas.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes, fontes nitrogenadas, fluorescência da clorofila, *Hevea brasiliensis*, trocas gasosas

Photorespiration and antioxidant metabolism in young rubber plants grown under different nitrogen sources (NO_3^- and NH_4^+)

ABSTRACT

In this study, the effects of nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) and of the absence of nitrogen (N) in photosynthesis, photorespiration and antioxidant metabolism of young rubber plants were evaluated. Plants were grown in sand irrigated with Bolle-Jones's nutrient solution, with the nitrogen final concentration (8mM) added in the following $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ proportions: 8/0, 0/8 and 0/0, respectively. The gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, photorespiration and antioxidant enzyme activities (SOD, CAT and APX) in leaves were evaluated. The net CO_2 assimilation rate (A) and the electron transport rate (ETR) were higher in NO_3^- -treated plants. Lowest ETR and higher photorespiratory activity were observed in plants treated with NH_4^+ . SOD activity was higher in leaves of plants treated with both N sources. Lower CAT and higher APX activities were found in NO_3^- -treated plants. Plants grown in the absence of N showed lowest values of A. We observed that the different N sources significantly affected the photosynthetic process and that NH_4^+ favored photorespiratory process in rubber plants.

Key words: antioxidant enzymes, nitrogen sources, chlorophyll fluorescence, *Hevea brasiliensis*, gas exchange

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 (Pallardys, 2008). A preferência das plantas pela fonte de N pode variar conforme as pressões seletivas e consequentes adaptações fisiológicas (Terce-Laforgue et al., 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, 2004).

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

A fotorrespiração é um dos maiores processos metabólicos associados à 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, por outro lado, é transportado para o peroxissomo e oxidado a glioxilato, ocorrendo a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O glioxilato é transaminado à glicina e transportado para as mitocôndrias onde é convertida em serina, etapa em que 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 (Glutamina sintetase/Glutamato sintase) para a formação de novos aminoácidos. A serina formada na mitocôndria é transportada para o peroxissomo e transformada a hidroxipiruvato, o qual 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 CO_2 , tornou-se possível a avaliação da fotorrespiração a partir das medidas das trocas gasosas. Esta 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 C_3 , a exemplo da seringueira, também pode ser avaliada mais claramente através das curvas da taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), em função da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) e da concentração intercelular de CO_2 (Ci), 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/Cc (curva de resposta da fotossíntese

líquida à concentração de CO_2 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 decorrente, principalmente, do FSII (Panda et al., 2008). Esta ferramenta é bastante utilizada para avaliar o desempenho fotossintético das plantas, sobretudo 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 e que produz quantidades de látex de alta qualidade para a produção de borracha natural (Rosado et al., 2006), possui grande potencial socioeconômico e ambiental. 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 et al., 1997; Lemos et al., 1999; Shan et al., 2012), a importância das fontes nitrogenadas sob a taxa de assimilação de CO_2 e o processo fotorrespiratório necessitam de uma compreensão melhor. Neste contexto, o presente trabalho teve, por objetivo, avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+) e da sua ausência na fotossíntese, no funcionamento do processo fotorrespiratório e no metabolismo antioxidativo de plantas jovens de seringueira.

Material e Métodos

Sementes de seringueira foram coletadas, selecionadas quanto à uniformidade de cor e do tamanho, e colocadas para germinar em canteiros contendo areia lavada em água corrente com 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 et al. (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 1000 mL 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 renovadas a intervalos de sete dias, procedimento este realizado até que as plantas atingissem sete meses, quando então foram feitas as avaliações fotossintéticas e a coleta do material para as análises bioquímicas.

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 das 09:00 às 11:00 horas da manhã. 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-se 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 as 19:00 e 20:00 horas; enfim, a fotorrespiração (Fr) foi calculada de acordo com Sharkey (1988).

Nas mesmas folhas em que foram realizadas as análises de trocas gasosas, determinou-se a curva de resposta ao fluxo de fótons fotossintéticos com auxílio de um fluorômetro portátil MINI-PAM (Walz Inc.). As avaliações foram feitas no período noturno, entre 19:00 e 20:00 horas. 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 $2458 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). 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 (Fv/Fm) foram calculados. O ETR e o NPQ foram calculados segundo Krall & 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-se um medidor portátil (clorofilômetro) da marca FT GREEN LLC e modelo atLEAF+.

As curvas de resposta da taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) ao aumento da concentração intercelular de CO_2 (C_i) foram realizadas variando-se a concentração de CO_2 na câmara de medida, somente nas plantas tratadas com nitrato e amônio. Para a curva A/C_c , a irradiância foi mantida constante a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, semelhante à das condições de crescimento das plantas sendo a concentração de CO_2 modificada gradualmente. Os valores das concentrações de CO_2 variaram de 0 a $1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$, em intervalos crescentes de $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (Pimentel et al., 2007). Para a elaboração da curva foi utilizado o modelo bioquímico desenvolvido por Farquhar et al. (1980) para plantas C_3 , utilizando-se valores de C_c ao invés de C_i , por meio do programa desenvolvido por Sharkey et al. (2007).

Com vista à 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 homogêneo 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 ultra-freezer para posteriores análises das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e 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 . A atividade da CAT foi determinada conforme Haver & McHale (1987) pelo decréscimo na absorbância a 240 nm , a cada 15 segundos, durante 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), através do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm . O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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 Tukey, a 5% de probabilidade.

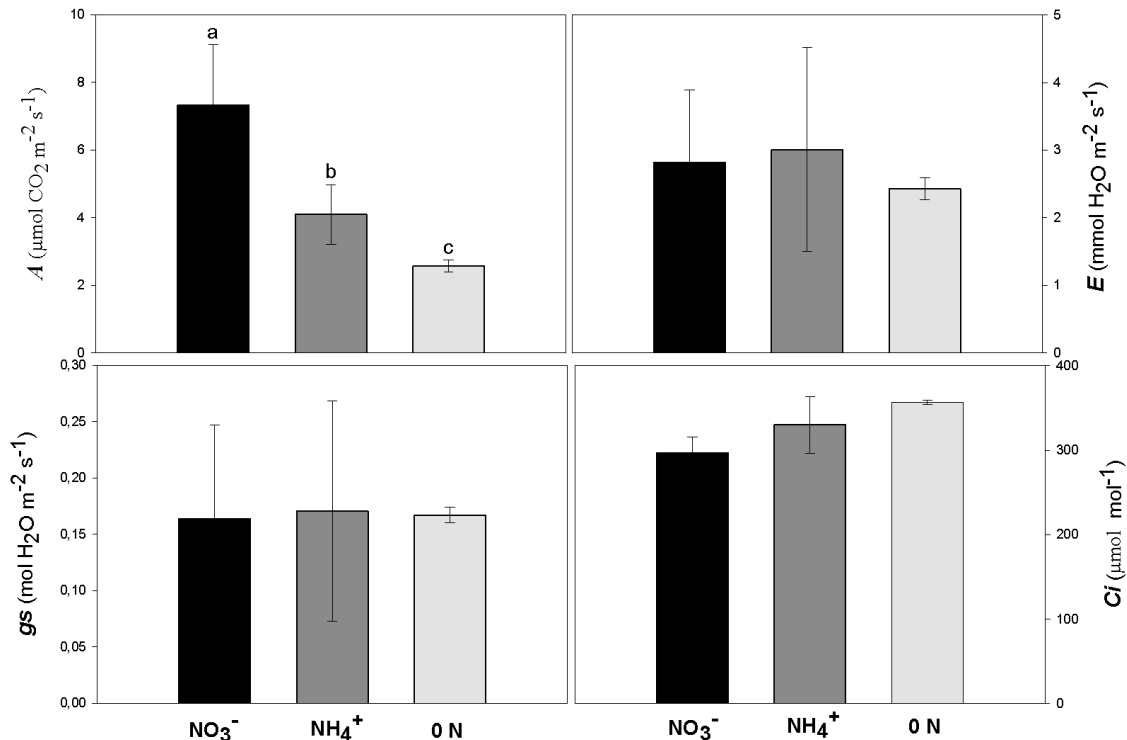
Resultados e Discussão

Verificou-se a importância do fornecimento das fontes nitrogenadas no metabolismo fotossintético. A taxa assimilatória líquida de CO_2 (A) foi favorecida pela presença de N, em especial em plantas tratadas com NO_3^- ($P<0.05$) e plantas cultivadas sem fonte de nitrogênio apresentaram os menores valores de A . 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).

Desde que não foram verificadas diferenças na g_s , E e C_i das folhas entre os tratamentos, a assimilação de carbono em plantas cultivadas na ausência de nitrogênio não foi limitada pelas trocas gasosas, sugerindo que a carência de nitrogênio, elemento essencial para a síntese de proteínas, pode acarretar em severa deficiência de todo o complexo enzimático das plantas, principalmente da Rubisco, a enzima responsável pela assimilação do carbono em cloroplasto de plantas C_3 .

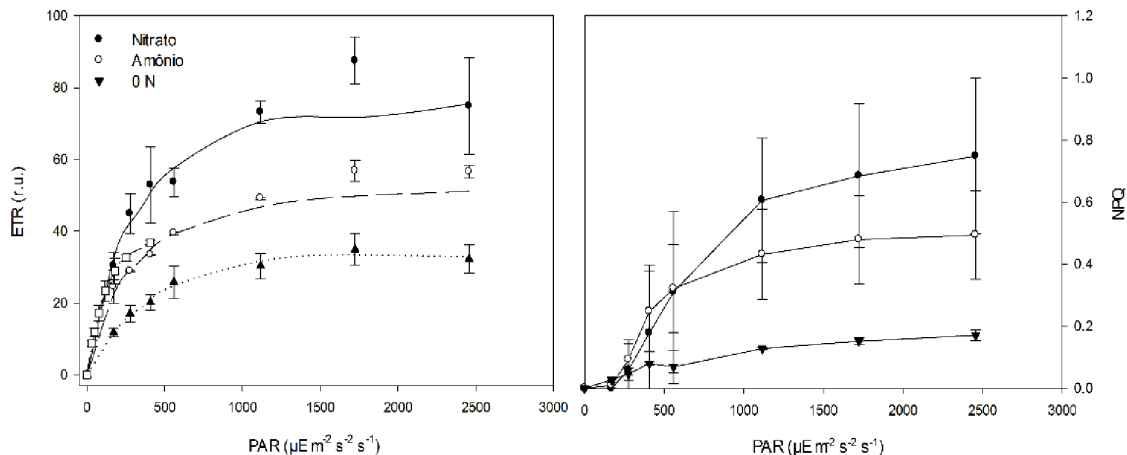
Observou-se, pelo estudo da fluorescência da clorofila, que a taxa de transporte de elétrons (ETR) foi maior em plantas cultivadas com NO_3^- e o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) menor em plantas sem nitrogênio (0 N) (Figura 2).

O coeficiente de extinção fotoquímico a $1116 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (qP_{1116}) (condição de irradiância mais semelhante às condições de crescimento das plantas) e a eficiência fotoquímica potencial do FSII (Fv/Fm) foram menores em plantas cultivadas na ausência de nitrogênio e semelhantes entre as plantas cultivadas com NO_3^- e NH_4^+ ($P<0.05$, Tabela 1). A taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{max}) foi favorecida pela presença do nitrogênio e em maior intensidade nas plantas tratadas com NO_3^- ($P<0.05$). A inclinação inicial da CRF (α) foi menor em plantas cultivadas na presença de nitrogênio. Similarmente, a irradiância mínima de saturação



Médias seguidas por letras diferentes representam diferença significativa a nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey

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



Barras representam média \pm desvio padrão de seis repetições

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)

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 (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e na ausência de N (0 N). Valores representam média \pm desvio padrão de seis repetições

Treatments	qP_{1116}	Fv/Fm	ETR_{max}	α	I_k	Clorofila
NO_3^-	1,07 a	0,75 a	78,73 a	1,32 b	324,94 b	35,99 b
NH_4^+	1,75 a	0,76 a	50,64 b	1,32 b	210,55 c	24,93 c
0 N	0,58 b	0,68 b	33,77 c	1,47 a	469,11 a	42,70 a

Valores representam média de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

(I_k) foi menor em plantas cultivadas na presença de N, em especial as tratadas com NH_4^+ . Os teores de clorofila foram maiores em plantas cultivadas na ausência de N (Tabela 1).

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 também para a síntese de clorofila, pigmento essencial para a atividade dos fotossistemas (FS). Verificou-se, porém, que plantas cultivadas na ausência deste elemento 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 garantir uma captação adequada 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 cultivadas na ausência de N apresentam maior irradiância mínima de saturação (I_k), o que indica maior quantidade de centros de reação do fotossistema II (FSII). Portanto, providas de um número maior 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.

Entretanto, essas plantas também apresentam menor coeficiente de extinção fotoquímico (qP), um indicador da proporção do FSII que está aberto (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 o emprego do N para a constituição do aparato fotoquímico, a redução na taxa assimilatória de carbono em plantas desprovidas de fonte nitrogenada (provavelmente devido à menor quantidade de Rubisco) é um fator limitante para a atividade fotoquímica em seus cloroplastos.

Devido às diferenças verificadas nas variáveis relacionadas à fotossíntese de plantas submetidas às diferentes fontes de N (A, ETR, ETR_{max} e I_k), uma curva da relação entre a taxa fotossintética (A) e a concentração interna de CO_2 no cloroplasto (Cc) foi elaborada para esses tratamentos (Figura 3). A partir deste modelo também foram ajustados os valores *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}) (Farquhar et al., 1980; Farquhar & Von Caemmerer, 1982). Observou-se que o ponto de saturação de CO_2 nas plantas tratadas com NO_3^- ($9,74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi superior ao das cultivadas com NH_4^+ ($8,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Além disto, as plantas tratadas com NH_4^+ apresentaram menores V_{cmax} , J, gm e J_{max} , e maior Rd em relação àquelas tratadas com NO_3^- .

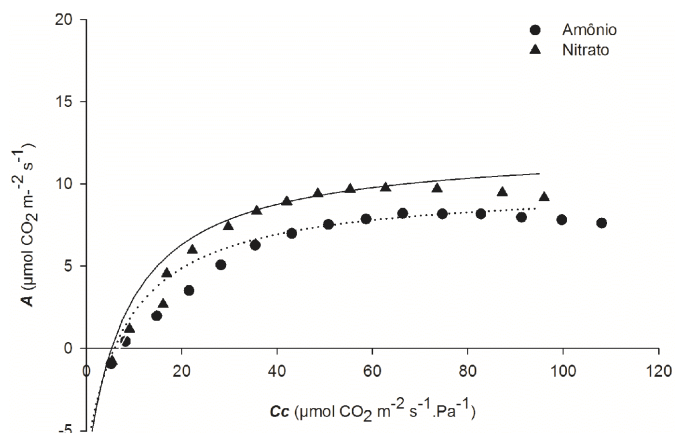


Figura 3. Taxa fotossintética (A) em função da concentração interna de CO_2 no cloroplasto (Cc) de plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato e amônio

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 mesofílica e (gm) da velocidade máxima de transporte elétrons (J_{max}) determinadas por medidas de trocas gasosas em plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+)

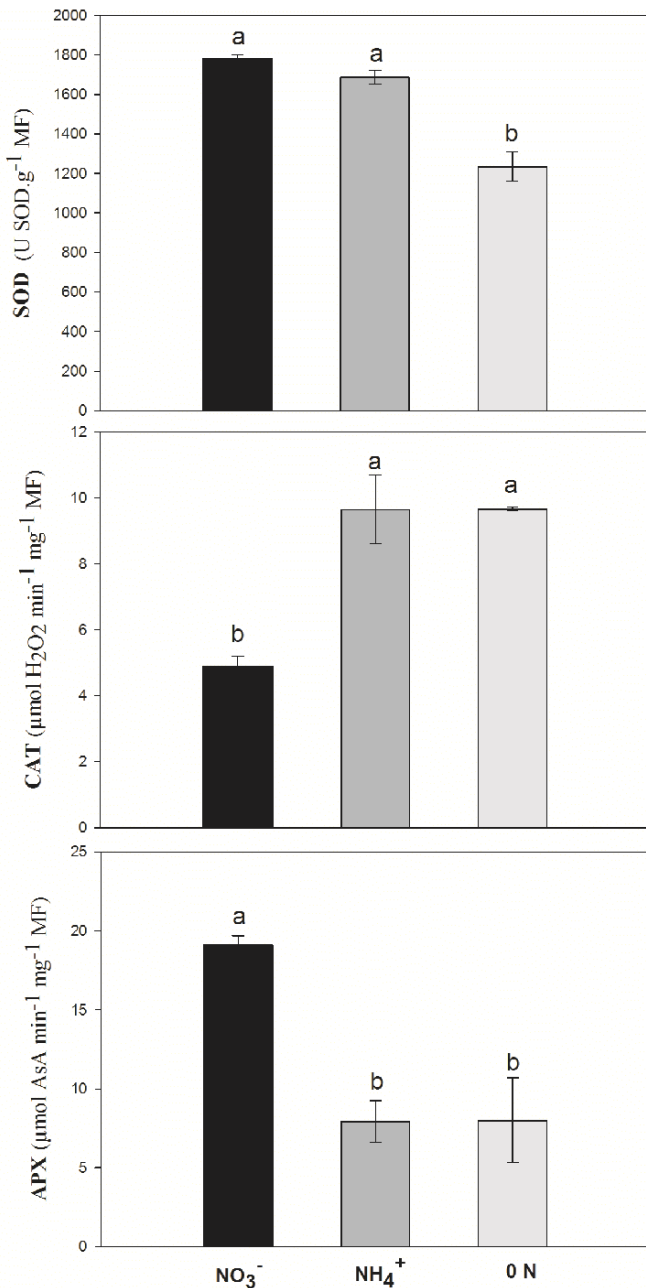
Parâmetros	Nitrato	Amônio
V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	42 a	33 b
J ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	52 a	43 b
TPU ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	3,4 a	3,0 a
Rd ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,83 b	0,98 a
gm ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)	30 a	17,99 b
J_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	53,03 a	43,96 b

Verifica-se que a limitação da atividade fotossintética de plantas tratadas com NH_4^+ se deve à 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 do que, 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^-).

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 sinaliza 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 que está envolvido na desativação das clorofilas no estado excitado singleto reduzindo a formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), evitando danos oxidativos ao fotossistema (Demmig-Adams & Adams, 2000). Menor NPQ serve como indicativo para maior produção de EROs (Hideg et al., 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 (Figura 4), um indicativo da presença de elevadas quantidades de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A CAT é a principal enzima responsável pela quebra desta 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).

Observou-se, no entanto, maior atividade da superóxido dismutase (SOD) nas folhas das plantas cultivadas na presença de N (NO_3^- e NH_4^+) enquanto as plantas tratadas com NO_3^- apresentaram menor atividade da catalase (CAT) e maior atividade da ascorbato peroxidase (APX) (Figura 4). 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.

As 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



Médias seguidas por letras diferentes representam diferença significativa a nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey

Figura 4. 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

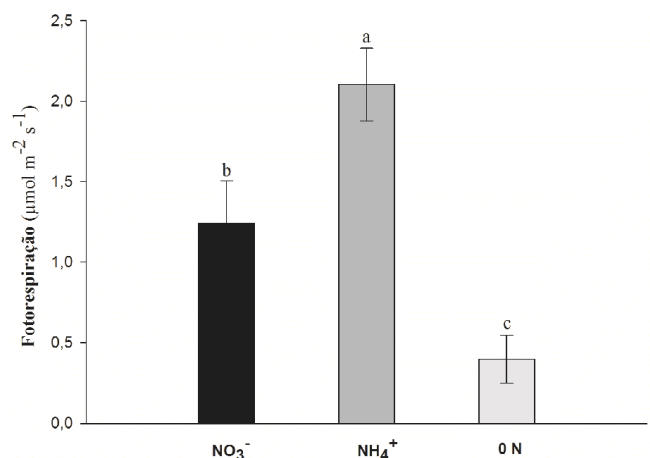
pelas atividades da CAT e APX (Foyer & Fletcher, 2001). A SOD, dentre as enzimas envolvidas na remoção das EROs, é considerada uma enzima-chave por ser a primeira a atuar no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (Pompeu et al., 2008). A APX e outras peroxidases têm alta afinidade, eliminando 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) devido ao processo fotorrespiratório.

Verificou-se, neste trabalho, que a atividade fotorrespiratória foi favorecida pela presença do nitrogênio sendo maior

nas plantas cultivadas com NH_4^+ (Figura 5), que também apresentaram maior atividade da CAT.

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^- . Porém, surge a seguinte 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 a uma atividade maior oxigenase da enzima; 2) o aumento da respiração mitocondrial (Rd) pode estar relacionado à maior demanda de ATP por parte da enzima glutamina sintetase no processo fotorrespiratório; 3) nas mesmas condições de *gs* e *Ci*, verificou-se menor condutância do mesofilo (*gm*) o que pode acarretar em menor difusão de CO_2 entre as células do mesofilo e, conseqüentemente, a 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; entretanto, os mecanismos envolvidos neste processo devem ser mais estudados visando à melhor compreensão dos metabolismos do carbono e nitrogênio em seringueira. A utilização de isótopos estáveis (^{15}N) seria uma alternativa para o esclarecimento desta questão.



Médias seguidas de letras diferentes representam diferença significativa a nível de $p \leq 0,05$, pelo teste de Tukey

Figura 5. 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

Conclusão

O cultivo de plantas jovens de seringueira na presença de NH_4^+ favorece o processo fotorrespiratório acarretando a diminuição das taxas de assimilação de carbono e aumento da

enzima catalase, quando comparadas às plantas cultivadas com NO₃⁻.

Literatura Citada

- Azevedo, R.A.; Alas, R.M.; Smith, R.J.; Lea, P.J. 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. *Physiology Plant*, v.104, n.2, p. 280–292, 1998. <<http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x>>.
- Baker, N.R. Chlorophyll Fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, v.59, n.1, p.89-113, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>>.
- Bernacchi, C.; Singaas, E.L.; Pimentel, C.; Portis Jr, A.R.; LONG, S. Improved temperature response functions for models of rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, v.24, n.2, p. 253-259, 2001. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00668.x>>.
- 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*, v.38, n.11, p. 1799-1809, 1987. <<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/38.11.1799>>.
- Bolle-Jones, E. W. Copper: its effects on the growth and composition of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). *Plantans Soil, Netherlands*, v. 10, n. 2, p. 168-178, 1957. <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01398923>>.
- Bykova, N. V.; Møller, I. M.; Gardeström, P.; Igamberdiev, A. U. The function of glycine decarboxylase complex is optimized to maintain high photorespiratory flux via buffering of its reaction products. *Mitochondrion*, v.19, part. B, p.357-364, 2014. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.01.001>>.
- Campbell, D.; Hurry, V.; Clarke, A.K.; Gustafsson, P.; Oquist, G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n.3, p.667–683, 1998. <<http://mmbr.asm.org/content/62/3/667.full.pdf>>. 22 Jun. 2014.
- 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*, v.21, n.3, p. 329-336, 1997.
- Demmig-Adams, B.; Adams, WW. Harvesting sunlight safely. *Nature*, v.403, n.6768, p 371–374, 2000. <<http://dx.doi.org/10.1038/35000315>>.
- During, H. CO₂ Assimilation and photorespiration of grapevines leaves: Responses to light and drought. *Vitis*, v. 27, p.199-208, 1988. <<http://www.vitis-vea.de/admin/volltext/e026477.pdf>>.
- 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*. v.42, n.3-4, p.199–215, 1988. <[http://dx.doi.org/10.1016/0304-3800\(88\)90057-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3800(88)90057-9)>.
- Farquhar, G.D.; Von Caemmerer, S. Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, 1982. Chap. 17, p. 549–587. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-68150-9_17>.
- Farquhar, G.D.; Von Caemmerer, S.; Berry, J.A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, v.149, n.1, p.78–90, 1980. <<http://dx.doi.org/10.1007/bf00386231>>.
- Foyer, C.H.; Fletcher, J.M. Plant antioxidants: colour me healthy. *Biologist*, v. 48, n.3, p.115-120, 2001.
- Giannopolitis, C.N.; Ries, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, n.2, p.309-314, 1977. <<http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>>.
- Havir, E. A.; Mchale, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987. <<http://dx.doi.org/10.1104/pp.84.2.450>>.
- 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*, v.49, n.12, p.1879-1886, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcn170>>.
- Jaleel, C. A.; Riadh, K.; Gopi, R.; Manivannan, P.; Ines, J.; Al-Juburi, H. J.; Chang-Xing, Z.; Hong-Bo, S.; Panneerselvam, R. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiology Plant*, v. 31, n.3, p. 427–436, 2009. <<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-009-0275-6>>.
- Krall, J.P.; Edwards, G.E. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves, *Physiologia Plantarum*, v.86, n.1, p.180–187, 1992. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01328.x>>.
- Lea, P.J., Azevedo, R.A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology*, v.149, n.3, p.243-247, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00101.x>>.
- Lemos, G.B. de; Delú-Filho, N.; Oliveira, L.E.M. de; Purcino, A.A.C. 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*, v.11, n.2, p.113-118,1999. <<http://www.cnpdia.embrapa.br/rbfv/pdfs/download.php?file=v11n2p113.pdf>>. 22 Jun. 2014.
- 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. <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405942-9.00005-0>>.
- Maxwell, K.; Johnson, G.N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, v.51, n.345, p 659–668, 2000. <<http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>>.
- Miller, A.J, Cramer, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil*, v.274, n.1-2, p.1-36, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1>>.
- Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, v.22, n.5, p.867-880, 1981. <<http://pcp.oxfordjournals.org.sci-hub.org/content/22/5/867.short>>. 22 Jun. 2014.

- Pallardys, S. G. Chapter 9 – Nitrogen metabolism. In: Pallardys, S.G. (Ed.). *Physiology of woody plants*. 3.ed. San Diego: Academic Press, 2008. p.233-254. <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-012088765-1.50010-5>>.
- 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*, v. 88, n.2, p. 127–133, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.08.012>>.
- Pimentel, C., Bernacchi, C., S. Long. Limitations to photosynthesis at different temperatures in the leaves of *Citrus limon*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.19, n.2, p.141-147, 2007. <<http://dx.doi.org/sci-hub.org/10.1590/S1677-04202007000200006>>.
- Pimentel, C.; Oliveira, R. F.; Ribeiro, R. V.; Santos, M. G.; Machado, E. C. Características fotossintéticas de *Phaseolus vulgaris* L. *Hoehnea*, v.38, n.2, p. 273-279, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062011000200007>>.
- Pompeu, G.B.; Gratão, P.L.; Vitorello, V.A.; Azevedo, R.A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola*, v. 65, n.5, p.548-552, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162008000500015>>.
- Redondo-Gómez, S.; Mateos-Naranjo, E.; Cambrollé, J.; Luque, T.; Figueroa, M.E.; Davy, A.J. Carry-over of differential salt tolerance in plants grown from dimorphic seeds of *Suaeda splendens*. *Annals of Botany*, v. 102, n.1, p. 103–112, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcn069>>.
- Rosado, P. L.; Pires, M. D. M.; Santos, D. F. D. Borracha natural: Mercado externo e interno. In: Alvarenga, A. D. P.; Rosado, P. L.; Carmo, C. A. F. de S. do; Tôsto, S. G. (Orgs.). *Seringueira: aspectos econômicos e sociais e perspectivas para o seu fortalecimento*. Viçosa-MG: Editora UFV, 2006. p. 49-72.
- Shan, A.Y. K.V.; Oliveira, L. E. M.; Bonome, L. T. S.; Mesquita, A. C. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, n.6, p.754-762, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000600004>>.
- Sharkey, T.D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiology Plant*, v.73, n.1, p.147–152, 1988. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09205.x>>.
- Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, G.D., Singaas, E.L. In Practice: Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell & Environment*, v.30, n.9, p.1035–1040, 2007. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01710.x>>.
- 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*, v.120, n.2, p.220-228, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0241.x>>.
- Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., Leegood, R.C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions B*, v.355, n.1402, p.1517–1529, 2000. <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2000.0712>>.
- Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M.; Govindjee; Sarin, N.B. 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*, v. 1797, n.8, p. 1428-1438, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.002>>.