



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO

**DINÂMICA DA DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO EM ALGODEIRO: RELAÇÕES
ENTRE ASSIMILAÇÃO DE NITRATO, FOTOSSÍNTESE E NÍVEIS DE AÇÚCARES.**

FORTALEZA

2018

CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO

DINÂMICA DA DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO EM ALGODEIRO: RELAÇÕES
ENTRE ASSIMILAÇÃO DE NITRATO, FOTOSSÍNTESE E NÍVEIS DE AÇÚCARES.

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira.

Coorientador: Me. Eliezer de Araújo Guilherme.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N194d Nascimento, Cristiano Silva do.

Dinâmica da deficiência de nitrogênio em algodoeiro : relações entre assimilação de nitrato, fotossíntese e níveis de açúcares / Cristiano Silva do Nascimento. – 2018.

53 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira.

Coorientação: Prof. Me. Eliezer de Araújo Guilherme.

1. *Gossypium hirsutum L.* 2. Metabolismo do nitrogênio. 3. Deficiência de N. 4. Fotossíntese. 5. Açúcares. I. Título.

CDD 661

**DINÂMICA DA DEFICIÊNCIA DE NITROGÊNIO EM ALGODEIRO: RELAÇÕES
ENTRE ASSIMILAÇÃO DE NITRATO, FOTOSSÍNTESE E NÍVEIS DE AÇÚCARES.**

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira.

Coorientador: Me. Eliezer de Araújo Guilherme.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ana Karla Moreira Lobo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Eliezer de Araújo Guilherme
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha amada mãe, Francisca Amélia.
À minha querida tia, Luciana.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

À minha amada mãe, por sempre acreditar em mim e por tornar esse sonho possível.

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira, pela excelente orientação e por toda a dedicação na hora de ensinar sobre ciência.

Ao futuro Dr. Eliezer de Araujo Guilherme, pela coorientação, dedicação, paciência e por sempre está à disposição para ajudar na minha caminhada científica.

À toda equipe do LABPLANT, Prof. Danilo, Adilton, Yugo, Paulo, Vicente, Valéria, Markos, Rikaely, Silvio, Raissa, Bruno e William pelo companheirismo, troca de experiências e incentivos.

Aos membros participantes da banca examinadora, Ana Karla Moreira Lobo e Eliezer de Araújo Guilherme pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao membro suplente da banca examinadora, Fabricio Eulálio Leite Carvalho, pela disponibilidade.

Aos colegas de turma da biotecnologia, em especial a Pâmella Luiza, Mathias Coelho, Gabrielly Oliveira, Melissa Ribeiro, Jonathan Santos, Claudiane Carvalho, Jessica Loren e Ruthielly Oliveira pela amizade e companheirismo durante toda a graduação.

Aos meus melhores amigos desde o ensino médio, Lucas Sombra, Natalia Oliveira, Kamelly Melo, Alice Ximenes, Sanara Ximenes, Jamelly Martins e Mateus Félix pela amizade e por sempre estarem ao meu lado, acreditando no meu potencial e sendo os melhores amigos que alguém pode ter.

À minha querida amiga de longa data, Sanara Ximenes, por me aguentar por mais de 10 anos e por sempre está presente na minha vida.

À minha tia Luciana, por ser um exemplo de dedicação e esforço.

À minha família, por todo o incentivo e por tornar esse sonho possível.

Ao programa de graduação em biotecnologia, por todo o apoio.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Foi uma estrada com muitos obstáculos. Mas fico feliz por ter sido assim, porque se eu não tivesse sofrido tanto para chegar até aqui, a lição poderia não ter sido tão nítida.”

- Ted Mosby.

RESUMO

A deficiência de nitrogênio (N) é um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e os mecanismos envolvidos são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica de deficiência de N e suas relações com alterações na assimilação de nitrato, fotossíntese e níveis de açúcar em plantas de algodoeiro. Para isso, as plantas foram germinadas em areia autoclavada, cultivadas em casa de vegetação e submetidas à solução nutritiva adaptada de Hoagland e Arnon com nitrato como única fonte de N. Após 22 dias, plantas previamente supridas com 10 mM NO_3^- foram expostas a dois níveis de NO_3^- : 0 mM e 10 mM por 8 dias, visando induzir um contraste na taxa de assimilação de NO_3^- . A depravação progressiva de N (como nitrato) induziu uma diminuição na biomassa das raízes (15%) e na parte aérea (41%). A privação de nitrato induziu mudanças na seguinte ordem nos parâmetros relacionados à nutrição nitrogenada: conteúdo de NO_3^- > atividade redutase de nitrato > concentração de frutose > teor de aminoácidos livres > teor de N-total > teor de clorofila total > concentração de glicose. Curiosamente, os parâmetros relacionados à eficiência da fotossíntese (assimilação de CO_2 e eficiência fotoquímica), além da concentração de sacarose, foram menos afetados durante o período de depravação de nitrato e deficiência de N no algodoeiro. Estes resultados mostram que plantas jovens de algodoeiro apresentam alta plasticidade fenotípica no uso de N ou eficiência para a fotossíntese, ou seja, são capazes de realizar altas taxas de fotossíntese com baixas concentrações de N. Entretanto, os melhores marcadores para indicar o status de N nas folhas (nitrato, aminoácidos, N total e clorofilas) não foram necessariamente os melhores para indicar distúrbios fisiológicos importantes, como na fotossíntese. Em conclusão, plantas de algodoeiro jovens previamente supridas com altos níveis de nitrato são capazes de mobilizar reservas de nitrogênio para atividade fotossintética. Nestas condições, o conteúdo de nitrato e a atividade de redutase de nitrato foram os indicadores mais sensíveis para indicar mobilização mais precoce de N das folhas, em comparação com os teores de N-total e de aminoácidos livres.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum L.*; Metabolismo do nitrogênio; Deficiência de N; Fotossíntese; Açúcares.

ABSTRACT

Nitrogen deficiency (N) is a limiting factor to plant growth and development, and the mechanisms involved are few understood. The objective of this work was to evaluate the dynamics of N deficiency and its relationships with changes in nitrate assimilation, photosynthesis and sugar levels in cotton plants. For this, the plants were germinated in autoclaved sand, grown in a greenhouse and subjected to nutrient solution adapted from Hoagland & Arnon with nitrate as the only source of N. After 22 days, plants previously supplied with 10 mM NO_3^- , were exposed to two levels of NO_3^- : 0 mM and 10 mM for 8 days, aiming to induce contrast in the assimilation rate of NO_3^- . The progressive N deprivation (as nitrate) induced a decrease in biomass of roots (15%) and shoots (41%). Nitrate deprivation induced changes in the following order in the parameters related to nitrogen nutrition: NO_3^- content > nitrate reductase activity > fructose concentration > free amino acid content > total N content > total chlorophyll content > glucose concentration. Interestingly, the parameters related to the efficiency of photosynthesis (CO_2 assimilation and photochemical efficiency), in addition to the sucrose concentration, were less affected during the period of nitrate deprivation and N deficiency in cotton. These results show that young cotton plants display high phenotypic plasticity of N use or efficiency for photosynthesis, that is, they are able to perform high rates of photosynthesis with low N concentrations. However, the best markers for indicating the N status in the leaves (nitrate, amino acids, total N and chlorophylls) are not necessarily best to indicate important physiological disturbances such as in photosynthesis. In conclusion, young cotton plants previously supplied with high levels of nitrate are able to mobilize nitrogen reserves for photosynthetic activity. In these conditions nitrate content and nitrate reductase activity are most sensitive indicators to indicate earlier N mobilization from leaves, as compared to N-total and free amino acid contents.

Keywords: *Gossypium hirsutum L.*; Nitrogen metabolism; N-deficiency; photosynthesis; Sugars.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção e área plantada de algodoeiro no Brasil	14
Figura 2	Diagrama esquemático da captação e assimilação de NO_3^- por células vegetais. Redutase de nitrato, NR; nitrito redutase, NiR; glutamina sintetase, GS; glutamato sintase, GOGAT	17
Figura 3	Esquema simplificado da fotossíntese. As reações de luz (fotoquímica) e o ciclo de Calvin-Benson juntos convertem a energia luminosa em energia química, na forma de açúcares. As plantas podem exportar os açúcares para outras partes da planta na forma de sacarose ou armazena-los na forma de amido	18
Figura 4	O papel central dos açúcares no metabolismo vegetal. Processos chave são encaixados em azul; os metabólitos principais estão em preto. Linhas sólidas representam o fluxo de carbono e energia; linhas tracejadas representam mecanismos de controle	20
Figura 5	Produção de metabólitos através do metabolismo de N e C em plantas. As plantas assimilam C e N inorgânicos a aminoácidos e açúcares via processos de assimilação de N e fotossíntese, respectivamente. As elipses verdes representam metabólitos contendo N, enquanto as elipses vermelhas indicam metabólitos fotossintéticos	22
Figura 6	Esquema sugerido por Noctor e Foyer (1998) mostrando que parte do NADH utilizado pela RN pode ser proveniente da redução citosólica do NAD^+ pelo malato produzido nos cloroplastos a partir da redução do oxaloacetato utilizando o NADPH da fotossíntese como doador de elétrons	23
Figura 7	Variação na biomassa de (A) raiz e (B) parte aérea de algodoeiro cultivado na presença de alto nível de nitrato (10 mM, +N) e deprivação de nitrato (0 mM, -N) entre os períodos de 0-6, 0-8 e 6-8 dias. Os valores representam médias ($n = 3$) \pm desvio padrão (DP) e * representa diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0,05$)	34
Figura 8	Mudanças na (A) atividade de redutase de nitrato e (B) assimilação de CO_2 em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- (0	

mM NO₃⁻) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle (10 mM NO₃⁻). O valor absoluto (VA_{100%}) representa a média ± DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. T_{50%} representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t (p <0,05) 35

Figura 9

Mudanças na (A) eficiência da assimilação de CO₂ – A/clorofilas, (B) eficiência da atividade de redutase de nitrato – RN/clorofilas e (C) eficiência fotossintética no uso de nitrogênio – A/N-total em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO₃⁻ (0 mM NO₃⁻) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle (10 mM NO₃⁻). O valor absoluto (VA_{100%}) representa a média ± DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. T_{50%} representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t (p <0,05) 36

Figura 10

Mudanças na (A) eficiência do PSII, (B) eficiência do PSI e (C) clorofilas totais em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO₃⁻ (0 mM NO₃⁻) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle (10 mM NO₃⁻). O valor absoluto (VA_{100%}) representa a média ± DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. T_{50%} representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t (p <0,05) 37

Figura 11

Mudanças na concentração de (A) nitrato, (B) N-amino solúvel e (C) nitrogênio total em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO₃⁻ (0 mM NO₃⁻) durante 8 dias. Os valores relativos são em

relação ao seu respectivo controle (10 mM NO_3^-). O valor absoluto ($\text{VA}_{100\%}$) representa a média $\pm \text{DP}$ das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. $T_{50\%}$ representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t ($p < 0,05$) 38

Figura 12 Mudanças na concentração de (A) glicose, (B) frutose e (C) sacarose em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- (0 mM NO_3^-) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle (10 mM NO_3^-). O valor absoluto ($\text{VA}_{100\%}$) representa a média $\pm \text{DP}$ das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. $T_{50\%}$ representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t ($p < 0,05$) 39

Figura 13 Correlação entre (A) Assimilação de CO_2 – A e atividade da redutase de nitrato - NR, (B) A e eficiência do PSII, (C) A e clorofila total, (D) A e nitrogênio total, (E) A e PSI, (F) A e aminoácidos livres, (G) A e glicose, (H) A e frutose e (I) A e sacarose em folhas de plantas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- (0 mM NO_3^-) durante 8 dias. O valor de r indica o coeficiente de correlação de Pearson enquanto que * indica que existe significância para $p \leq 0.05$ 40

Figura 14 Correlação entre (A) Atividade de redutase de nitrato – NR e aminoácidos livres, (B) NR e nitrogênio total, (C) NR e nitrato, (D) NR e glicose, (E) NR e frutose, (F) NR e sacarose, (G) NR e clorofila total, (H) NR e eficiência do PSII e (I) eficiência do PSI em folhas de plantas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- ($\text{DN} - 0 \text{ mM NO}_3^-$) durante 8 dias. O valor de r indica o coeficiente de correlação de Pearson enquanto que * indica que existe significância $p \leq 0.05$ 41

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	25
3.	METODOLOGIA	26
4.	RESULTADOS	31
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÕES	45
	REFÉRENCIAS	46
	APÊNDICE A	54

1. INTRODUÇÃO

Importância do algodoeiro

O algodoeiro herbáceo (*Gossypium hirsutum L.*) é uma das plantas domesticadas mais importantes para a humanidade. As plantas de algodão são cultivadas em diversos países do mundo, distribuídos por todos os continentes, sendo considerado o mais importante das fibras têxteis, naturais ou artificiais (CORRÊA, 1998). Consome-se mais de 19 milhões de toneladas de fibra por ano, com produção quase igual ao consumo, e rendimento de 603 kg de fibra/ha (INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE, 2002), com previsão de aumento do consumo em mais de 40% nos próximos vinte anos, tendo somente a fibra, o principal produto do algodoeiro, mais de 400 aplicações industriais (CORRÊA, 1998). Nos últimos anos, o Brasil tem se mantido entre os cinco maiores produtores mundiais (Figura 1), ao lado de países como China, Índia, EUA e Paquistão e ocupa o primeiro lugar em produtividade em condições de sequeiro. O rendimento e a qualidade do algodão são influenciados pelas condições genéticas e ambientais (RAMEY, 1986; REDDY *et al.*, 1999). A deficiência de nitrogênio (N) ou potássio (K) diminui a produção de algodão limitando a expansão da área foliar e a capacidade de assimilação de CO₂ (BRADOW & DAVIDONIS, 2000; REDDY *et al.*, 2004).

Figura 1. Área plantada, produção e produtividade de algodoeiro no Brasil.



SAFRA 2017/2018			
ESTADO	PREVISÃO DE ÁREA (em ha)	PREVISÃO DE PRODUÇÃO (em toneladas)	PREVISÃO DE PRODUTIVIDADE (em Kg/ha)
BA	272.000	514.080	1.890
GO	34.096	54.852	1.609
MA	22.500	38.000	1.689
MG	24.000	38.000	1.583
MS	30.900	55.110	1.783
MT	721.000	1.081.500	1.500
PI	7.000	13.860	1.980
PR	638	757	1.186
SP	7.500	12.600	1.680
TO	6.000	9.225	1.538
TOTAL	1.125.634	1.817.984	1.615

Fonte: ABRAPA (2017)

Importância do nitrogênio nas plantas

O nitrogênio (N) é o nutriente mineral mais importante para as plantas. Como as plantas requerem uma maior quantidade de N dentre todos os elementos minerais, sua deficiência é um fator limitante para o crescimento das plantas (CORUZZI & BUSH, 2001; CORUZZI, 2003; MILLER *et al.*, 2007; SCHACHTMAN & SHIN, 2007; KROUK *et al.*, 2010). O nitrogênio é necessário para a síntese de aminoácidos, proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, lipídios e uma variedade de outros metabólitos. O nitrato e o amônio são as fontes inorgânicas mais disponíveis para a aquisição de nitrogênio, sem considerar o dinitrogênio atmosférico que só pode ser usado por organismos procariotos (BLOOM J., 2015). A maioria das plantas agrícolas podem usar tanto o amônio quanto o nitrato. Em solos arejados, o nitrato é a forma predominante de N inorgânico, enquanto que nos solos alagados ou solos ácidos o amônio predomina. Isso ocorre devido à rápida oxidação biológica do ion NH_4^+ para nitrito e nitrato. (XU *et al.*, 2012). A abundância de nitrato nos solos pode variar de 0 a 10 mM e pode atingir 100 mM em campos altamente adubados (LE DEUNFF & MALAGOLI, 2014).

Durante o crescimento da planta, o nitrato é absorvido da solução do solo por processo de transporte ativo através da membrana plasmática das células das raízes. Devido a alta variabilidade espacial da concentração de nitrato no solo (Miller *et al.*, 2007), dois sistemas de absorção de nitrato existem nas raízes, de alta e baixa afinidade. São conhecidas duas famílias de genes que codificam os transportadores responsáveis pela absorção de nitrato pelas raízes ou por sua translocação na planta (Tsay *et al.*, 2007). A família NITRATE TRANSPORTER 1 (NRT1) possui 53 membros, enquanto que a família NRT2 possui 7 membros em *Arabidopsis thaliana*. O primeiro gene isolado relacionado ao transporte de nitrato, AtNRT1.1 codifica um transportador de afinidade dupla, que atua em baixas ou altas concentrações de nitrato na solução do solo (Liu *et al.*, 2003).

Além disso, a proteína NRT1.1 foi proposta de atuar como um sensor de NO_3^- , necessário para a adaptação morfológica de raízes e consequentemente para exploração do solo visando uma maior eficiência da aquisição de N (Remans *et al.*, 2006). Especificamente, em *Arabidopsis* NRT2.1 e NRT2.2 são responsáveis por até 80% do transporte de nitrato quando presente em concentrações a níveis micro molares (Li *et al.*, 2007). Além da sua importância como fonte de nitrogênio para as plantas, o nitrato é uma molécula sinalizadora que modula a síntese de citocininas, que por sua vez controla processos de desenvolvimento, síntese de proteínas e aquisição de macro e micronutrientes (Hirose *et al.*, 2008).

A deficiência de nitrogênio afeta o crescimento e o desenvolvimento das culturas, com sintomas que incluem a clorose foliar, plantas de baixa estatura e rendimentos diminuídos

(CORUZZI & BUSH, 2001; KUSANO *et al.*, 2011). Em muitas regiões agrícolas, os aumentos na produção de culturas dependem da fertilização química do nitrogênio. O consumo de fertilizantes nitrogenados em todo o mundo aumentou mais de nove vezes desde 1960 (HINSINGER *et al.*, 2011). No entanto, o uso excessivo de fertilizantes químicos causou sérios problemas ambientais, como a eutrofização e o aquecimento global (GRUBER & GALLOWAY, 2008; ZHANG *et al.*, 2015). Compreender os mecanismos de adaptação da planta à deficiência de N é crucial para melhorar a eficiência de uso de N pela cultura e reduzir a fertilização química deste nutriente. Tem sido bem documentado que as plantas desenvolveram vários mecanismos para adaptação em solos com deficiência de N (HERMANS *et al.*, 2006; SCHEIBLE *et al.*, 2004), com respostas conhecidas incluindo aumento da absorção, translocação e remobilização de órgãos fonte para tecidos em crescimento e alteração da partição de carboidratos (FAN *et al.*, 2009; KRAPP *et al.*, 2011; PAUL & DRISCOLL, 1997).

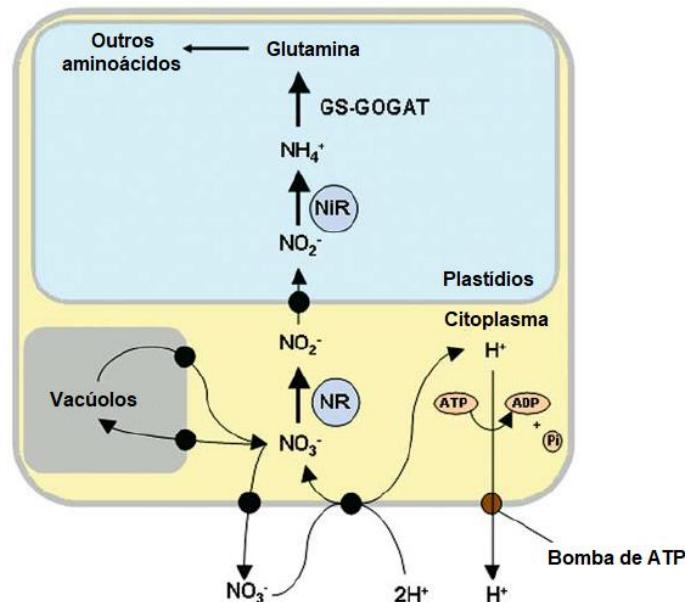
As plantas assimilam nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) como fonte primária de N (LAM *et al.*, 1996; STITT *et al.*, 2002; YAMAYA E OAKS, 2004; TABUCHI *et al.*, 2007). Posteriormente, o N assimilado é utilizado para produzir aminoácidos (CORUZZI & ZHOU, 2001; STITT *et al.*, 2010). A absorção de nitrato é mediada por uma proteína transportadora de NO_3^- induzida pelo próprio íon (CAMPBELL, 1999). Além de seu papel como nutriente, o nitrato também é um importante sinal para respostas moleculares, metabólicas e fisiológicas nos níveis locais e de planta inteira (ALVAREZ *et al.*, 2012). De fato, o nitrato fornece sinais que modulam a expressão dos genes de assimilação de nitrato (KRAPP *et al.*, 2014), regulam o desenvolvimento das raízes laterais, aliviam a dormência das sementes e modulam a morfogênese foliar (FORDE & WALCH-LIU 2009; ALBORESI *et al.*, 2005).

A redução assimilatória do nitrato pelas plantas é um processo biológico fundamental, no qual uma forma altamente oxidada de nitrogênio inorgânico é reduzida a amônia. Esta amônia se torna, por sua vez, combinada com esqueletos de carbono para formar os diferentes compostos nitrogenados biológicos (Figura 2) (LOSADA *et al.*, 1979). A conversão de nitrato em amônia é um processo de redução de oito elétrons que ocorre em duas etapas. Dentro da célula, o primeiro passo é uma redução (2 elétrons) do nitrato em nitrito, catalisada pela enzima redutase de nitrato (NR, EC 1.6.6.1). O NAD(P)H serve como doador fisiológico de elétrons para essa reação em eucariotos. A redutase de nitrato catalisa a redução de NO_3^- para NO_2^- e sua atividade é induzível por nitrato. A atividade da NR é o passo limitante da conversão de N-NO_3^- para a síntese de aminoácidos (CAMPBELL, 1999). Em folhas tal processo é amplamente dependente do fluxo de nitrato das raízes (FERRARIO-MÉRY *et al.*,

1998). O nitrato é o principal regulador da taxa de indução e degradação da NR (KAISER & HUBER, 1994).

O segundo passo é o transporte do nitrito para o cloroplasto, onde ocorre sua redução (seis elétrons) em amônio, catalisada pela enzima redutase de nitrito (NiR). Esta etapa é acoplada ao transporte de elétrons fotossintéticos em algas e plantas superiores através de ferredoxina reduzida, um produto das reações bioquímicas da fotossíntese, que serve como doador de elétrons para a redutase de nitrito (SOLOMONSON & BARBER, 1990). O amônio é incorporado aos esqueletos de carbono pela geração de glutamina através do ciclo da glutamina sintetase/glutamina oxoglutarato aminotransferase ou glutamato sintase (GS/GOGAT) (SANZ-LUQUE *et al.*, 2015). Assim, a assimilação de nitrato parece ocorrer por uma via linear relativamente simples compreendendo dois transportes (transporte de nitrato e nitrito) e duas etapas de redução (envolvendo NR e NiR) (CHAMIZO-AMPUDI *et al.*, 2017).

Figura 2. Diagrama esquemático da captação e assimilação de NO_3^- por células vegetais. Redutase de nitrato, NR; nitrito redutase, NiR; glutamina sintetase, GS; glutamato sintase, GOGAT.



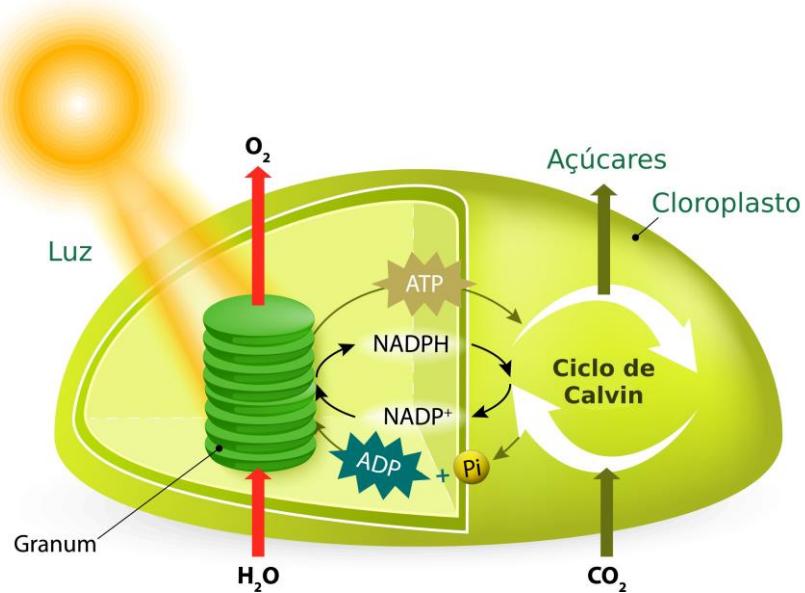
Fonte: adaptado de Crawford *et al.* (2000).

Importância da fotossíntese

Embora o crescimento das plantas seja controlado por uma multiplicidade de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, a fotossíntese é um fenômeno chave, que contribui

substancialmente para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A energia química gasta em uma série de processos metabólicos é, de fato, derivada do processo de fotossíntese, que é capaz de converter a energia luminosa em uma forma química utilizável de energia (TAIZ & ZEIGER, 2010). No processo de fotossíntese, dois eventos principais ocorrem obrigatoriamente: reações fotoquímicas, em que a energia luminosa é convertida em ATP e NADPH e oxigênio é liberado, e reações redutoras referentes ao ciclo de Calvin-Benson, em que o CO₂ é fixado em carboidratos, utilizando os produtos da fotoquímica, ATP e NADPH (Figura 3) (LAWLOR, 2001, TAIZ & ZEIGER, 2010; DULAI *et al.*, 2011). Essas rotas metabólicas são cruciais para o provimento da energia necessária para suprir a demanda energética inerente ao crescimento da planta.

Figura 3. Esquema simplificado da fotossíntese. As reações de luz (fotoquímica) e o ciclo de Calvin-Benson juntos convertem a energia luminosa em energia química, na forma de açúcares. As plantas podem exportar os açúcares para outras partes da planta na forma de sacarose ou armazena-los na forma de amido.



Fonte: Adaptado de Designua/Shutterstock.com

A capacidade fotossintética varia amplamente em diferentes folhas de uma mesma planta, sendo frequentemente limitada por restrições difusivas (estomática e mesofílica) e bioquímicas (KOZLOWSKI & PALLARDY, 1997). Diferenças existentes nas características bioquímicas e na estrutura física foliar exercem grande influência na capacidade fotossintética, resultando em várias limitações à fotossíntese (GUO *et al.*, 2002). Além de

limitações difusivas, alterações na atividade das enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (BOYER, 1995; FOYER *et al.*, 1994; KANECHI *et al.*, 1996; PAUL & DRISCOLL, 1997), podem afetar significativamente a magnitude das taxas fotossintéticas. Com efeito, sob condições de radiação saturante e temperatura moderada, a atividade catalítica da Rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) limita, em última instância, a fixação do CO₂ (SAGE, 2002).

A fim de atender à demanda da crescente população mundial, serão necessários aumentos significativos no rendimento das principais culturas cultivadas nos países em desenvolvimento. No arroz, por exemplo, um aumento estimado de 50% no rendimento é necessário até 2030 (KHUSH & PENG, 1996). Aumentar o potencial de rendimento máximo é visto como uma parte importante, se não vital, de qualquer estratégia para alcançar este aumento de produtividade (KHUSH & PENG, 1996). Como o índice de colheita para muitas culturas está se aproximando de um valor máximo, um aumento no potencial de produção terá que envolver ganho na biomassa de colheita, ou seja, será necessário um aumento da fotossíntese líquida (CASSMAN, 1994; YING & COLS. 1998a; MANN, 1999a, b). Isto pode ser alcançado por aumento no índice de área foliar (IAF) ou na fotossíntese líquida por unidade de área foliar. Como o IAF geralmente já é alto na maioria das culturas, o acréscimo da produção deve vir da fotossíntese melhorada.

O aumento da produtividade é determinado pela capacidade das plantas em produzir fotoassimilados. Neste sentido, elevar a capacidade fotossintética tem sido intensivamente considerado uma vez que a fotossíntese é o processo inicial para a produção de biomassa (JIANG *et al.*, 2000). Segundo Lawlor (1995), a produção de biomassa pode ser acrescida por meio de alterações da duração do crescimento da cultura, da sua taxa de crescimento ou ambos, uma vez que estes processos estão diretamente relacionados à fotossíntese e à eficiência de absorção da energia luminosa. Jiang e colaboradores (2002) evidenciaram uma associação entre a eficiência de absorção da energia luminosa, medida por meio da eficiência quântica da fluorescência da clorofila *a* e da capacidade de produção de grãos.

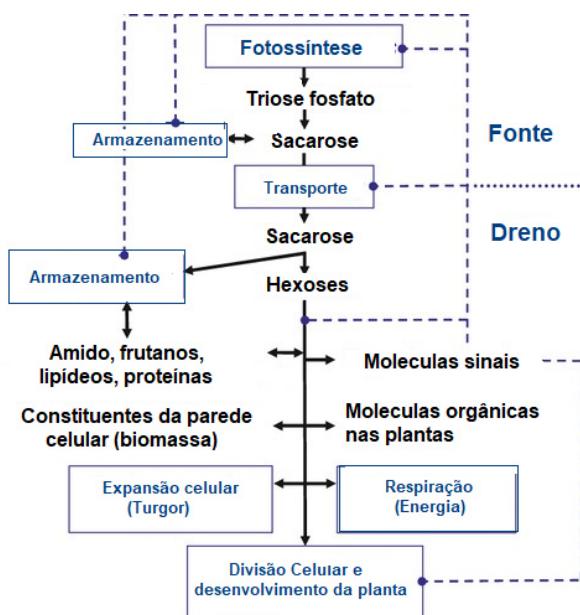
Importância dos açúcares

Os açúcares estão no centro do metabolismo primário nas plantas (Figura 4). Todo o carbono fixado durante a fotossíntese passa por açúcares e derivados de açúcares. A maior parte do carbono fixo é primeiro liberado dos cloroplastos na forma de triose fosfato, através de intermediários de ácidos orgânicos, no caso de plantas C4 e CAM, depois convertidos em

hexoses no citosol de células fotossintéticas (fonte). Este pool de açúcares está disponível para exportação imediata para órgãos heterotróficos (dreno) como raízes, frutos ou tubérculos, entre outros. A exportação é estendida para períodos de fotossíntese diminuída, esgotando as reservas de curto prazo de açúcares vacuolares ou amido cloroplástico (DENNIS & BLAKELEY, 2000; MALKIN & NIYOGI, 2000). Para a maioria das plantas, a sacarose é a principal forma na qual o carbono é transportado por longas distâncias, no floema. Cerca de 80% do CO₂ assimilado durante a fotossíntese é canalizado para a síntese de sacarose (KOCH, 2004).

Tal açúcar é a principal forma de transporte de carbono orgânico exportado da fonte fotossintética para os órgãos e, portanto, esse metabólito é crucial para a sobrevivência e produtividade das plantas (WELFARE *et al.*, 2002; KOCH, 2004; CHIOU & BUSH, 1998). Algumas espécies transportam outros derivados de açúcares, juntamente com a sacarose, nomeados de oligossacarídeos da família da rafinose (RO) ou álcoois de açúcares (ZIEGLER, 1975). O conhecimento desses mecanismos não é importante apenas para entender o crescimento e o desenvolvimento das plantas, mas também é um pré-requisito para a manipulação genética das relações fonte-dreno nas plantas transgênicas para aumentar o rendimento das culturas (ROITSCH, 1999).

Figura 4. O papel central dos açúcares no metabolismo vegetal. Processos chave são encaixados em azul; os metabólitos principais estão em preto. Linhas sólidas representam o fluxo de carbono e energia; linhas tracejadas representam mecanismos de controle.



Fonte: Adaptado de W. Patrick *et al.* (2013)

Açúcares solúveis, que são comumente definidos como mono e dissacarídeos, desempenham um papel importante na estrutura e função de todas as células vivas (HIRABAYASHI, 1996). Assim, glicose e frutose são fontes onipresentes de carbono e energia para células eucarióticas. Em organismos fotossintéticos, especialmente plantas superiores, a sacarose e toda a matriz de enzimas e proteínas relacionadas ao seu processamento se desenvolveram em um papel central entre a fotossíntese, o transporte e a utilização heterotrófica (SALERNO & CURATTI, 2003). Variações em fatores ambientais, como luz, água ou temperatura, ataques por patógenos ou herbívoros e outros, podem levar a uma diminuição significativa na eficiência da fotossíntese nos tecidos fonte e, assim, reduzir o suprimento de açúcares solúveis para os tecidos. Sob condições de privação de açúcares, mudanças fisiológicas e bioquímicas ocorrem para sustentar a respiração e outros processos metabólicos (JOURNET, 1986; YU SM., 1999).

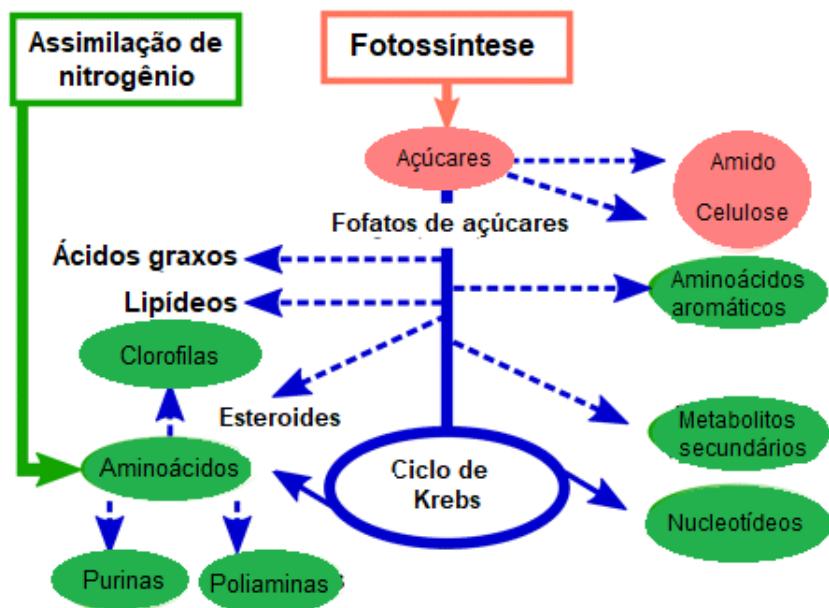
Inter-relações entre assimilação de nitrato, fotossíntese e níveis de açúcares.

O metabolismo do carbono (C) e N são fortemente coordenados por serem processos fundamentais que permitem o crescimento das plantas (Figura 5). Por exemplo, fotossíntese e absorção de N, tendo em vista que o metabolismo de N é considerado um dreno forte de esqueletos de C e de poder redutor (CORUZZI & BUSH, 2001; THUM *et al.*, 2003; URBANCZYK-WOCHNIAK & FERNIE, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2007). Em contrapartida, a Rubisco representa o maior dreno de N foliar, uma vez que esta enzima representa cerca de 50% da proteína solúvel total do vegetal (PARRY *et al.*, 2013). Assim, sob condições de alta concentração de nitrato, a síntese de aminoácidos é estimulada, a qual pode favorecer a síntese de Rubisco e de outras proteínas, as quais promovem estímulo da fotossíntese e de produção de biomassa (TERCÉ-LAFORGUEA *et al.*, 2004).

Interações complexas entre redes bioquímicas de vias metabólicas existem em muitos aspectos do metabolismo do N envolvendo a captação e regulação de N, redução e sinalização de N, metabolismo e transporte de aminoácidos, interações entre o metabolismo de N e C e a translocação e remobilização de N (SCHEIBLE *et al.*, 2004; DIAZ *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2008; VIDAL & GUTIERREZ, 2008; KROUK *et al.*, 2010). Os metabolitos primários (por exemplo, aminoácidos, açúcares, fosfatos de açúcares e ácidos orgânicos) bem como metabolitos secundários (por exemplo, fenilpropanóides) são componentes das redes complexas de vias bioquímicas no metabolismo das plantas. A assimilação de nitrato leva a mudanças marcantes no metabolismo do carbono, incluindo o aumento da síntese de ácidos

orgânicos (KAISER & FOSTER 1989; FOYER & FERRARIO 1994) e menor síntese de amido (WARING *et al.* 1985; HOFSTRA *et al.* 1985; FICHTNER & SCHULZE, 1992).

Figura 5. Produção de metabólitos através do metabolismo de N e C em plantas. As plantas assimilam C e N inorgânicos a aminoácidos e açúcares via processos de assimilação de N e fotossíntese, respectivamente. As elipses verdes representam metabólitos contendo N, enquanto as elipses vermelhas indicam metabólitos fotossintéticos.

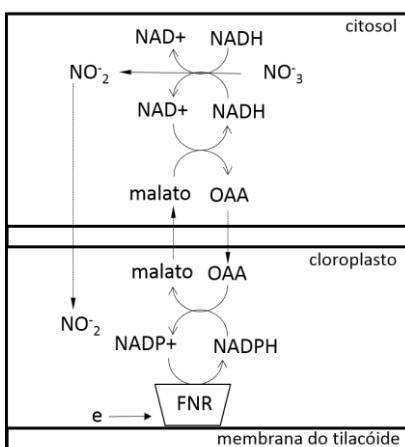


Fonte: Adaptado de Kusano *et al.* (2011)

O NO_3^- assimilado pode ser armazenado nos vacúolos ou reduzido a nitrito no citosol pela enzima redutase de nitrato (RN), que reduz o NO_3^- a NO_2^- (nitrito) com consumo de NADH. Noctor e Foyer (1998) sugeriram que uma parte do NADH utilizado pela RN seja proveniente da redução citosólica do NAD^+ pelo malato produzido nos cloroplastos a partir da redução do oxaloacetato utilizando o NADPH da fotossíntese como doador de elétrons (Figura 6). Dessa forma, apesar de estar localizada no citosol, a RN pode apresentar um papel importante como dreno de elétrons em condições de excesso de elétrons nos cloroplastos. Após a redução do nitrato a nitrito pela RN, o nitrito é rapidamente transportado para os cloroplastos em tecidos fotossintetizantes e para os plastídios em raízes, a fim de ser reduzido a amônio pela enzima redutase de nitrito (RNI), que consome seis elétrons por meio da ferredoxina reduzida (Fd_{red}) para cada molécula de amônio produzida. Nos cloroplastos, a Fd_{red} provém da fase fotoquímica da fotossíntese (LEA *et al.*, 1999). A partir da média da relação C/N das plantas,

pode-se estimar que cerca de 20% dos elétrons produzidos fotossinteticamente sejam consumidos para a redução de nitrato.

Figura 6. Esquema sugerido por Noctor e Foyer (1998) mostrando que parte do NADH utilizado pela RN é proveniente da redução citosólica do NAD⁺ pelo malato produzido nos cloroplastos a partir da redução do oxaloacetato utilizando o NADPH da fotossíntese como doador de elétrons.



Fonte: adaptado de Noctor e Foyer (1998)

Por exemplo, em plantas de cevada (*Hordeum vulgare*) do tipo selvagem ou mutantes deficientes em NR recebendo amônio como sua única fonte de N, os fluxos fotossintéticos de oxigênio se igualaram aos do dióxido de carbono. Por outro lado, plantas do tipo selvagem expostas ao nitrato apresentaram fluxos desiguais de oxigênio e dióxido de carbono: a evolução do oxigênio em luz alta excedeu o consumo de dióxido de carbono em 26% (BLOOM *et al.* 1989). Estes resultados foram tomados para indicar que, na cevada, uma porção substancial do transporte fotossintético de elétrons gera um dreno para a assimilação do nitrato ao invés da fixação de carbono (CHAMPIGNY 1995). Também é necessário regular a taxa de assimilação de nitrato e a síntese de aminoácidos em resposta a mudanças na disponibilidade de carboidratos.

Outro exemplo é a observação de que plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transformado com baixa atividade de Rubisco têm baixos níveis de açúcares, baixa atividade de redutase de nitrato (NR), baixos níveis de aminoácidos e acumulam grandes quantidades de nitrato (STITT & SCHULZE 1994), o que fornece evidências de que a assimilação de nitrato é inibida quando o nível de carboidratos é baixo. Além disso, os níveis de transcritos para várias enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio mudam após a suplementação

de açúcares. Açúcares fornecidos exogenamente levam a um aumento do transcrito para a NR (CHENG *et al.* 1992; VINCENTZ *et al.* 1993; KRAPP & STITT 1995), um aumento do transcrito para a glutamina sintetase citosólica (GS1; LAM *et al.*, 1996), e uma diminuição do transcrito para asparagina sintase (LAM *et al.*, 1996). Os açúcares também estão implicados na ativação pós-traducional da NR (KAISER & SPILL, 1991; KAISER & HUBER, 1994).

A síntese de sacarose em folhas destacadas e iluminadas de trigo (*Triticum spp.*) foi limitada pela exposição em curto prazo ao nitrato. Uma redução linear na síntese líquida de sacarose foi observada quando a concentração de nitrato na solução aumentou de 0 a 10 mM NO_3^- com um coeficiente de correlação próximo a um (VAN QUY *et al.*, 1991b). Durante os primeiros 20 minutos de alta concentração de NO_3^- nas folhas de trigo iluminadas na presença de $^{14}\text{CO}_2$, a diminuição na síntese de (^{14}C) - sacarose foi compensada por um aumento da incorporação de (^{14}C) no malato e nos aminoácidos aspartato, glutamato, serina, glicina (CHAMPIGNY *et al.* 1995). Houve um grande aumento enorme nos pools de asparagina e glutamina e a relação glutamina/glutamato aumentou 300 vezes.

Recentemente, Sun, Ye, Peng e Li (2016) demonstraram que o suprimento elevado de N mitigou os efeitos adversos induzidos pela alta luz oscilante na fotossíntese de plantas de arroz. Em paralelo, Jin, Yang, Tan e Zhao (2015) relataram que o N elevado favoreceu o desempenho fotossintético de plantas de milho em condições de campo. Infelizmente, nesses estudos, os autores não foram capazes de explicar quais mecanismos relacionados ao metabolismo do nitrogênio estavam envolvidos com a melhora da fotossíntese. Em outros termos, essas respostas poderiam ser devidas a diferenças no status N da folha, mudanças na via assimilatória de nitrato, alterações no metabolismo fotorrespiratório ou devido a uma combinação de todos esses processos.

De fato, a maioria dos trabalhos publicados envolvendo assimilação de nitrogênio, fotossíntese e níveis de açúcares não são capazes de explicar quais mecanismos estão relacionados e como os metabolismos do nitrogênio e carbono se comportam em relação à dinâmica de deficiência em nitrogênio. Portanto, é cada vez mais importante encontrar soluções amplamente aplicáveis para reduzir a fertilização química de N, sem diminuir a produção das culturas. Além disso, buscar novos marcadores de deficiência em N em campo são necessários e inovadores. Neste estudo, mudanças na dinâmica da assimilação de nitrato, assimilação de CO_2 e níveis de açúcares em plantas de algodoeiro com deficiência em N foram avaliados.

2. OBJETIVOS

Geral

- Avaliar a dinâmica de deficiência em nitrogênio (refletida pelo metabolismo foliar e caracterização fisiológica) em plantas de algodoeiro.

Específicos:

- Avaliar as relações entre a assimilação do nitrato, fotossíntese e níveis de açúcares em plantas deficientes em nitrogênio através de parâmetros bioquímicos, trocas gasosas, eficiência fotoquímica e correlações de Pearson.
- Fornecer informações fundamentais para identificar as estratégias empregadas pelas plantas para lidar com a deficiência de nitrogênio.

3. METODOLOGIA

Material vegetal e condições experimentais

Sementes de algodão (*Gossypium hirsutum L.*) transgênico FM 954 GLT foram cedidas pela empresa BAYER e selecionadas pelo seu tamanho. Inicialmente, foi realizada a desinfecção das sementes com NaClO 0,5% (v/v) por 5 minutos e posteriormente foram lavadas por 3 vezes com água destilada e embebidas em água destilada por 4 horas. Após o período de embebição, as sementes foram postas em areia autoclavada para germinar. Cinco dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos de plástico (2,5 L) contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), adaptada com nitrato como única fonte de N, suprida com 2,5 mM de NO_3^- ($\text{pH } 5,5 \pm 0,5$) na primeira semana e nas semanas seguintes as concentrações foram aumentadas gradativamente até alcançar a 10 mM NO_3^- .

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do Laboratório de Metabolismo de Plantas (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-CE cuja localização é $3^{\circ}44'$ sul; $38^{\circ}33'$ oeste (nível do mar), e as condições ambientais foram as seguintes: temperatura média de $32^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ (dia/noite), fotoperíodo de 12/12h (luz/escuro), umidade relativa média do ar de 60% e ‘Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD)’ médio de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Experimento de dinâmica da deficiência de nitrogênio durante oito dias

Vinte e dois dias após a germinação deu-se inicio a deprivação de NO_3^- . As plantas foram divididas em dois grupos e supridas com solução nutritiva adaptada de Hoagland & Arnon tendo o nitrato como única fonte de N: com 0 mM NO_3^- , representando a deprivação de NO_3^- , ou 10 mM NO_3^- , representando o controle ou referência, por 8 dias. Plantas supridas com 10 mM NO_3^- receberam 5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Todos os macronutrientes e micronutrientes foram suplementados da mesma forma nos dois tratamentos. As concentrações de NO_3^- foram ajustadas a cada dois dias. As mensurações da fotossíntese *in vivo* foram realizadas a partir das 10:00 h em uma terceira folha totalmente expandida, sem contar as folhas cotiledonares. Folhas similares foram utilizadas para determinar a atividade de redutase de nitrato e coletadas para as análises bioquímicas, também a cada dois dias.

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

A assimilação de CO_2 (A) foi mensurada em folhas maduras totalmente expandidas utilizando um analisador de gás infravermelho portátil (IRGA) (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA). As condições dentro da câmara do IRGA durante as medições foram:

PPFD de 1500 $\mu\text{mol fóttons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 28 ° C, deficit de pressão do valor do ar $1,0 \pm 0,2 \text{ kPa}$ e pressão parcial de CO₂ de 40 Pa. A quantidade de luz azul utilizada foi ajustada para 10% do PPFD para maximizar a abertura estomática (Flexas *et al.*, 2008).

A fluorescência da clorofila *a* *in vivo* foi medida utilizando um Dual-PAM 100 (Walz, Alemanha). Para a medida pontual, utilizou-se 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PPFD por 5 min (indução), seguido de 5 min de escuro (recuperação) e, posteriormente, 5 min a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (reindução). Os parâmetros de fluorescência foram medidos usando o método de pulso de saturação (Schreiber *et al.*, 1994) e as folhas foram previamente aclimatadas ao escuro por 30 min. A intensidade e a duração do pulso de saturação foram 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 0,6 s, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados: rendimento quântico efetivo do PSII [$\Phi_{\text{PSII}} = (\text{Fm} - \text{Fs}) / \text{Fm}'$]; e o rendimento quântico fotoquímico do PSI [$\Phi_{\text{PSI}} = 1 - \Phi(\text{ND}) - \Phi(\text{NA})$].

Concentração de nitrato, aminoácidos livres totais e N-total.

Para a determinação da concentração de nitrato e aminoácidos livres totais, utilizou-se 20 mg da amostra para a extração com 1 mL de água deionizada a 65°C por 1 hora. Em seguidas, o extrato foi centrifugado a 20000 g por 30 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C.

A concentração de nitrato no tecido foi realizada segundo Cataldo *et al.* (1975). Alíquotas de 0,1 mL de extrato foram misturadas a 0,2 mL da solução de ácido salicílico 5% (m/v) e adicionado a 4,7 mL de NaOH 2 N, agitado e levado para leitura de absorbância em espectrofotômetro a 410 nm. A concentração foi obtida a partir da curva padrão de KNO₃ e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ MS do tecido.

A concentração de aminoácidos livres foi realizada segundo Peoples *et al.* (1989). Alíquotas de 0,1 mL de extrato (completadas até 0,5 mL com água destilada q.s.p) foram misturadas com 0,25 mL de tampão citrato 0,2 M (pH 5,0) + 0,25 mL solução de ninhidrina 5% (m/v) e KCN 0,2 mM. O material foi agitado em vórtex e levado ao banho-maria (100 °C por 15 minutos) para o desenvolvimento da cor característica (azul-violeta). Ao final deste período, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo e então foram adicionados 1,5 mL de etanol 60% (v/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 570 nm. A concentração foi obtida a partir da curva padrão de glutamina e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol AA g}^{-1}$ MS do tecido.

A determinação do nitrogênio total foi realizada de acordo com Baethgen e Alley (1989). A digestão das amostras ocorreu da seguinte maneira, 30 mg das amostras de folhas

liofilizadas foram adicionadas a 1,1 g de catalizador (sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio) e 1,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado em tubos de ensaio. Posteriormente, esses tubos devem ser acondicionados em um bloco digestor para que o processo de mineralização pudesse ocorrer. A temperatura do bloco digestor foi aumentada gradualmente, da seguinte forma:

- 100° C e manter por 15 min;
- 150° C e manter por 15 min;
- 250° C e manter por 15 min;
- 350° C e manter por 30 min;

Terminada a mineralização, o mineralizado foi dissolvido com água destilada, agitado e transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado para tal. Foram coletadas alíquotas de 2 mL que foram armazenadas a -80 °C.

Alíquotas de 0,2 mL do mineralizado foram misturadas com 1,1 mL da solução I (fosfato de sódio dibásico 188,79 mM, tartarato de sódio e potássio 177,17 mM; e NaOH), 0,8 mL da solução II (solução de salicilato de sódio 15% + nitroprussiato de sódio 0,03%) e 0,4 mL da solução III (dicloisocianurato de sódio 0,31%). O material foi agitado em vórtex e levado ao banho-maria (37 °C por 15 minutos). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 650 nm. A concentração foi obtida a partir da curva padrão da solução padrão de N (2500 µg/10 mL) e os resultados foram expressos em (mg N/100 mg MS) do tecido.

Determinação de glicose, frutose e sacarose

Para a determinação da concentração de glicose, frutose e sacarose, utilizou-se 20 mg da amostra para a extração com 1mL de água deionizada a 65°C por 1 hora. Em seguidas, o extrato foi centrifugado a 20000 g por 30 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C.

Glicose e frutose foram quantificadas através de um método enzimático acoplado à monitoração da produção de NADH com um espectrofotômetro a 340 nm (kits de teste da Sigma, Sigma-Aldrich). Todos os reagente (químicos e enzimas) utilizados na determinação foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. Para a glicose, foram utilizadas alíquotas de 10 µL do extrato com 1 mL do reagente de ensaio da glicose (HK), agitados e levados ao termo-shaker a 30° por 50 minutos. Para a frutose, foram utilizadas alíquotas de 25 µL do extrato com 5 µL do reagente PGI (fosfoglicose isomerase) e 0,5 mL do reagente de ensaio da glicose (HK). A mistura foi agitada e levada ao termo-shaker a 30 °C por 50 minutos. As leituras foram

realizadas em espectrofotômetro a 340 nm. O teor desses açúcares foi expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

A concentração de sacarose foi realizada segundo Van Handel *et al.* (1968). Alíquotas de 0,1 mL do extrato foram misturadas com 0,1 mL de KOH 30% (m/v), agitadas e levadas a banho-maria (100 °C por 10 minutos). Após o resfriamento, foi adicionado 3 mL de solução de antrona 0,2% (p/v) e, novamente, agitado e levado a banho-maria (40 °C por 20 minutos). Após o resfriamento, as amostras foram agitadas e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm. O teor de sacarose foi expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

Teor de clorofilas

A extração de clorofilas foi feita segundo Porra *et al.* (1989), 25 mg da amostra liofilizada foi congelada e macerada com nitrogênio líquido, em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de extração acetona 80% contendo tampão fosfato de sódio 2.5 mM pH 7.8 para minimizar a conversão da clorofila em feofitina. O extrato foi centrifugado a 16000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 663 nm e 646 nm. O teor de clorofila total foi calculado e expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

Eficiência da assimilação de CO₂ (A/clorofilas), eficiência da atividade de redutase de nitrato (RN/clorofilas) e eficiência fotossintética no uso do nitrogênio (A/N-total)

A eficiência de assimilação de CO₂ foi calculada a partir da relação de A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) dividida pelo teor de clorofilas totais (mg MS). A eficiência da atividade de redutase de nitrato foi calculada pela relação de RN ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MF) dividida pelo teor de clorofilas totais (mg MS). A eficiência fotossintética no uso do nitrogênio foi calculada pela relação de A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) dividida pelo teor de nitrogênio total (mol N m⁻²).

Biomassa da parte aérea e raiz

As partes aéreas e as raízes das plantas de algodão foram coletadas em sacos de papel, levadas para a estufa a 50° C e ficaram lá até a massa seca se estabilizar. A massa seca foi pesada e utilizada para o cálculo do incremento de biomassa da parte aérea e da raiz durante o período de tratamento de depravação de N.

Análises estatísticas e delineamento experimental

O experimento foi arranjado em um experimento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (2 níveis de nitrato x 5 tempos de coletas) e três repetições. Cada uma das

repetições representa uma planta. As médias dos resultados foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Para estimar as relações entre alguns parâmetros fisiológicos, as variáveis selecionadas foram correlacionadas pelo coeficiente de correlação de Pearson (r).

4. RESULTADOS

A partir do quarto dia após a retirada do nitrato da solução nutritiva, pode ser observados níveis de N abaixo de 2,5% em base de massa seca de folhas de algodoeiro, caracterizando o início de deficiência nutricional de nitrogênio (READ *et al.*, 2006). Como ilustrado na Figura 7A, o incremento de biomassa de raiz foi reduzida significativamente em 15% em relação ao controle no oitavo dia de deprivação de N. A Figura 7B, mostra que o incremento de biomassa de parte aérea foi mais afetado do que na raiz, com reduções significativas, em comparação ao controle, de 26% e 41% no sexto e oitavo dia de deprivação de nitrato, respectivamente.

A assimilação de CO₂ e atividade de RN mostraram dinâmicas distintas ao longo da deprivação, seguida da deficiência de N (Fig. 8). Como mostrado na Figura 8A, à atividade de redutase de nitrato foi reduzida a 50% da sua atividade inicial após três dias de deprivação de N e no oitavo dia as plantas apresentavam apenas 20% do seu valor inicial. A Figura 8B mostra que a assimilação de CO₂ apresentou uma resposta tardia a suspensão de NO₃⁻, respondendo somente após o quarto dia e decrescendo em 39% do seu valor inicial no oitavo dia da suspensão da fonte de N.

A eficiência da atividade de redutase de nitrato no uso de clorofilas (RN/clorofilas) apresentou uma dinâmica diferenciada da eficiência da assimilação de CO₂ no uso de clorofilas (A/clorofilas) e da eficiência fotossintética no uso de nitrogênio (A/N-total) durante a deprivação de N. A eficiência de RN/clorofilas caiu de forma linear, perdendo mais de 50% no oitavo dia da retirada do nitrato da solução nutritiva (Fig. 9B). A eficiência de A/clorofilas aumentou de forma progressiva, atingindo seu máximo no quarto dia de deprivação de nitrato com 185% do seu valor inicial. Após esse período, a eficiência sofre uma queda e termina em 155% do seu valor inicial no oitavo dia de fome de N (Fig. 9A). Uma dinâmica semelhante à eficiência de A/clorofilas pode ser observada em A/N-total, porém com um decaimento mais acentuado. A eficiência de A/N-total cresce ao longo dos dias, atingindo seu máximo no sexto dia de deprivação de nitrato com 190% da sua eficiência inicial e sofre uma queda após esse período, decaindo para 128% do seu valor inicial no oitavo dia da suspensão da fonte de N (Fig. 9C).

A figura 10 mostra que a eficiência do PSII e a eficiência do PSI apresentam uma dinâmica semelhante à da assimilação de CO₂ durante a deprivação de nitrato. A eficiência do PSII decaiu de forma suave a partir do segundo dia, atingindo 73% do seu valor inicial no oitavo dia de deprivação de N (Fig. 10A). A eficiência do PSI somente após o quarto dia de deprivação de N, a 80% e 66% do valor inicial no sexto e oitavo dia da deprivação da fonte de N, respectivamente (Fig. 10B). Já o teor de clorofilas totais mostrou mudanças precoces à

retirada da fonte de N da solução nutritiva, apresentando uma dinâmica de decaimento bem acentuada; 50% do teor inicial de clorofilas foram perdidos após sete dias e apenas 38% do teor ainda estavam presentes no oitavo dia de deprivação de N (Fig. 10C).

A concentração de nitrato foliar mostrou respostas rápidas à retirada do NO_3^- , decaindo rapidamente e atingindo 50% da concentração inicial durante os dois primeiros dias após a retirada do nitrato e apenas 14% da concentração inicial de nitrato foi mantida até o oitavo dia de deprivação de N (Fig. 11A). O conteúdo de aminoácidos livres nas folhas decaiu de progressivamente até cinco dias de deprivação, atingindo 50% do seu conteúdo inicial e estabilizando em seguida, com 46% do conteúdo inicial de aminoácidos no oitavo dia após a retirada da fonte de N da solução (Fig. 11B). O conteúdo de N-total apresentou uma dinâmica semelhante a do conteúdo de aminoácidos livres durante a deprivação de nitrato, o N-total decaiu de forma progressiva até cinco dias de deprivação, atingindo 50% do seu conteúdo inicial e estabilizando em seguida, com 49% do valor inicial de N-total no oitavo dia de deprivação de N (Fig. 11C).

A concentração de glicose aumentou atingindo 200% do seu valor inicial após seis dias de deprivação do nitrato, atingindo 203,4% da concentração inicial no oitavo dia após a retirada da fonte de N (Fig. 12A). Em contrapartida, a concentração de frutose caiu progressivamente, atingindo 50% da concentração inicial após o quarto de deprivação de nitrato e apenas 37% do valor inicial de frutose no oitavo dia de deprivação da fonte de N (Fig. 12B). Já a concentração de sacarose decaiu até 70% no quarto dia de deprivação de nitrato e em seguida, apresentou um suave aumento para 76% da concentração inicial de sacarose no oitavo dia de deprivação de N (Fig. 12C).

Para investigar as correlações entre variáveis medidas neste estudo, quando expostas a deprivação de nitrato, foi utilizada a correlação de Pearson (Fig. 13-14). Como resultado, podemos observar que a assimilação de CO_2 de plantas deficientes de N, está correlacionada positivamente de forma significativa apenas com a eficiência do PSII ($r = 0,975$) (Fig. 13B) e com o conteúdo de clorofila total ($r = 0,931$) (Fig. 13C). De maneira não esperada, não houve uma correlação significativa (ao nível de $p \leq 0,05$) entre a assimilação de CO_2 e atividade de redutase de nitrato, porém essa correlação apresentou um alto r ($r = 0,71$) e a eficiência do PSI ($r = 0,78$), assim como com a glicose ($r = 0,79$) e a frutose ($r = 0,8$) (Fig. 13).

Já no caso da atividade de redutase de nitrato, houve correlações positivas e significativas com as diversas formas de nitrogênio: aminoácidos livres ($r = 0,938$) (Fig. 14A), N-total ($r = 0,985$) (Fig. 14B) e nitrato ($r = 0,932$) (Fig. 14C). E houve também uma correlação negativa e significativa com a glicose ($r = -0,951$) (Fig. 14D). Sacarose ($r = 0,88$), clorofilas totais ($r =$

0,85) e eficiência do PSII (0,79) apresentaram um alto valor se r , porém esses valores não foram significativos ao nível de $p \leq 0,05$ (Fig. 14).

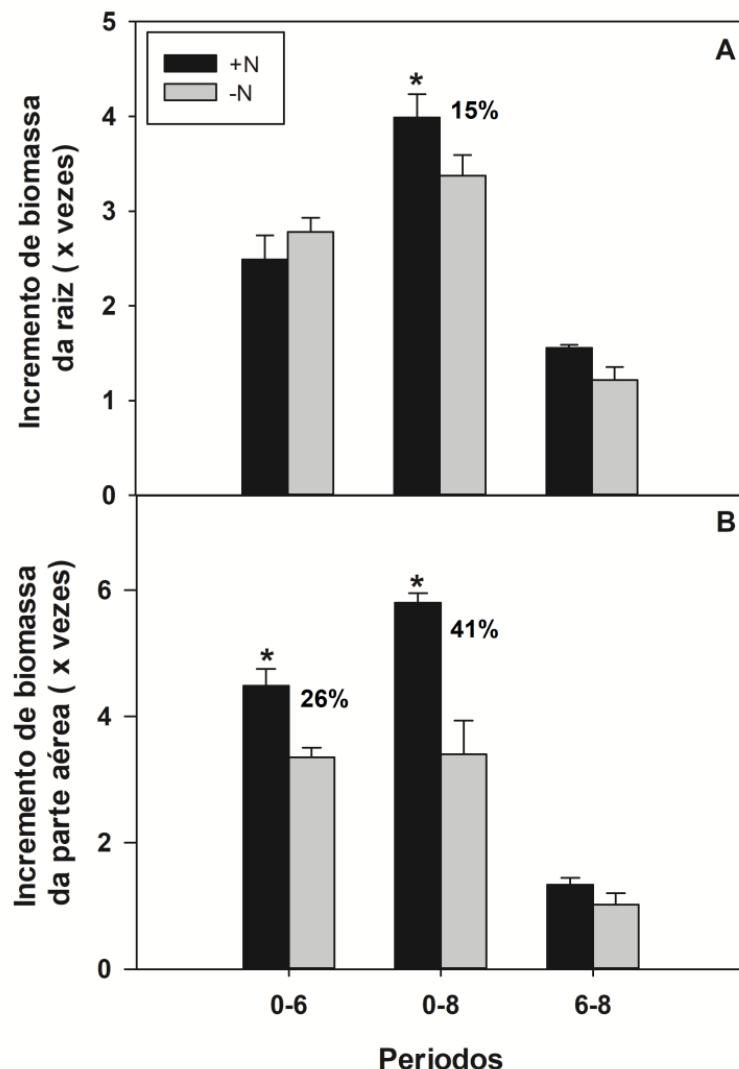


Figura 7. Variação na biomassa de (A) raiz e (B) parte aérea de algodoeiro cultivado na presença de alto nível de nitrato (10 mM, +N) e deprivação de nitrato (0 mM, -N) entre os períodos de 0-6, 0-8 e 6-8 dias. Os valores representam médias ($n = 3$) \pm desvio padrão (DP) e * representa diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0,05$).

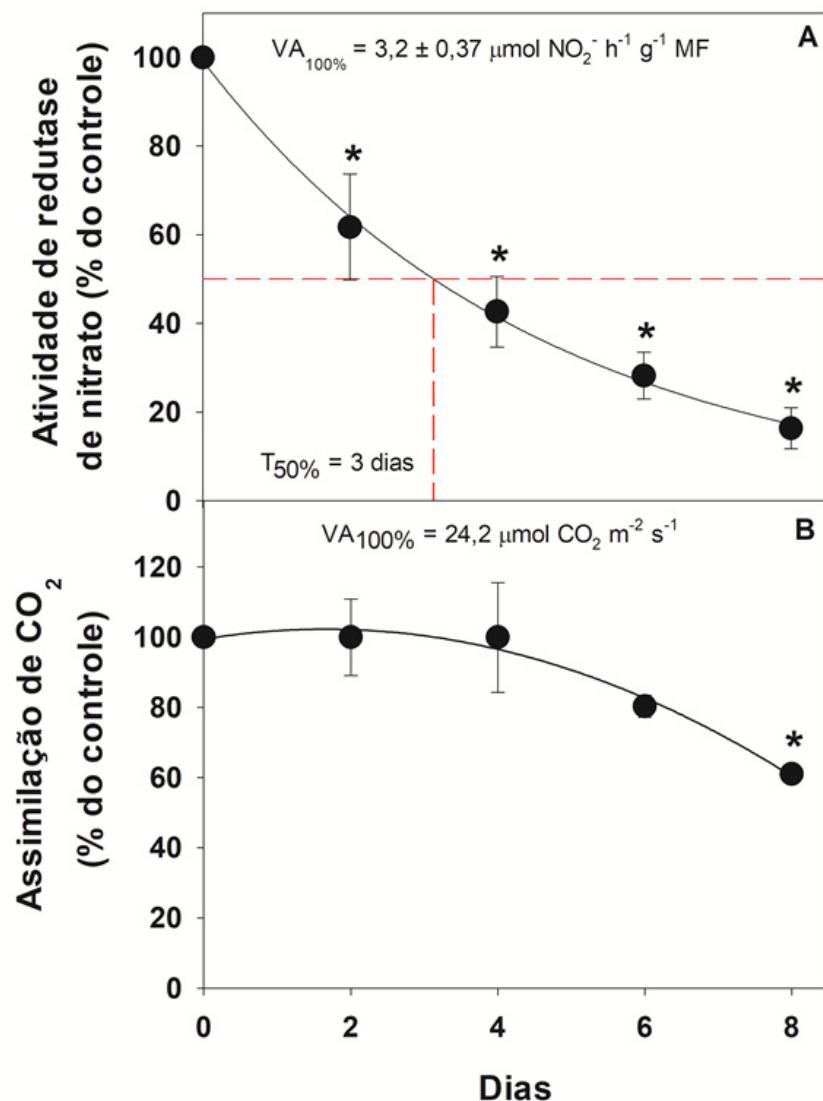


Figura 8. Mudanças na (A) atividade de redutase de nitrato e (B) assimilação de CO_2 em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- ($0 \text{ mM } \text{NO}_3^-$) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle ($10 \text{ mM } \text{NO}_3^-$). O valor absoluto ($VA_{100\%}$) representa a média \pm DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. $T_{50\%}$ representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t ($p < 0,05$).

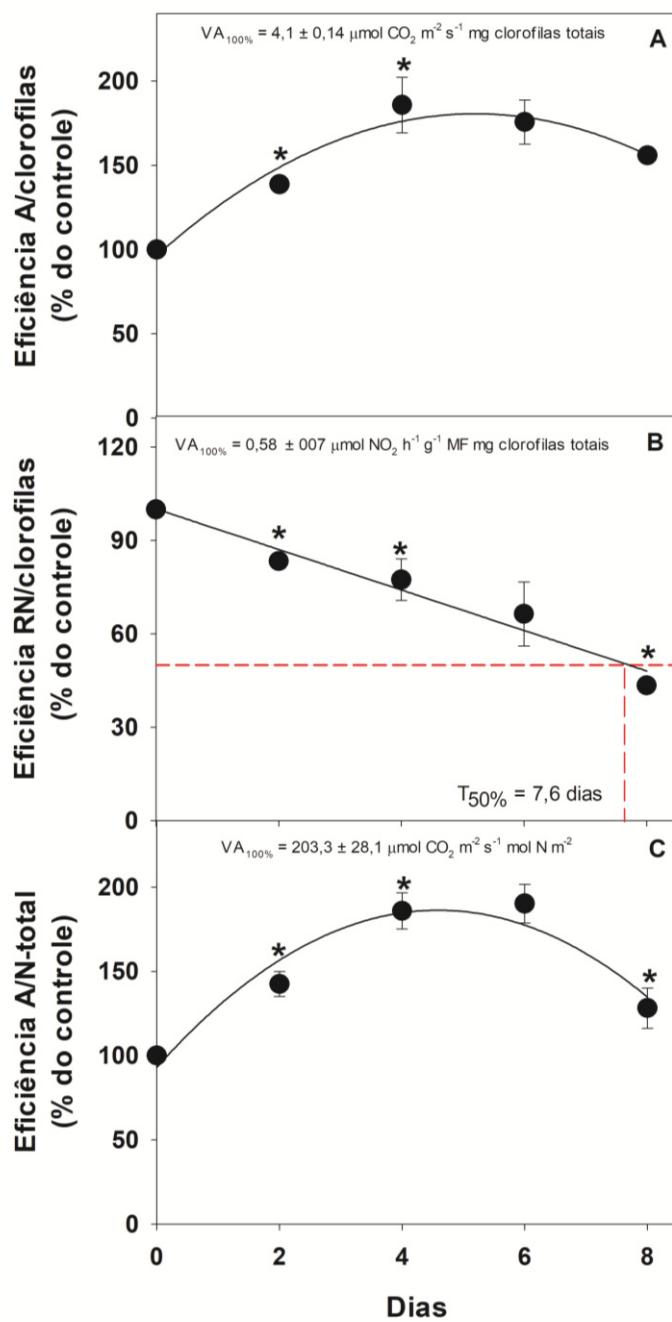


Figura 9. Mudanças na (A) eficiência da assimilação de CO₂ – A/clorofilas, (B) eficiência da atividade de redutase de nitrato – RN/clorofilas e (C) eficiência fotossintética no uso de nitrogênio – A/N-total em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO₃⁻ (0 mM NO₃⁻) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle (10 mM NO₃⁻). O valor absoluto (VA_{100%}) representa a média ± DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. T_{50%} representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t (p <0,05).

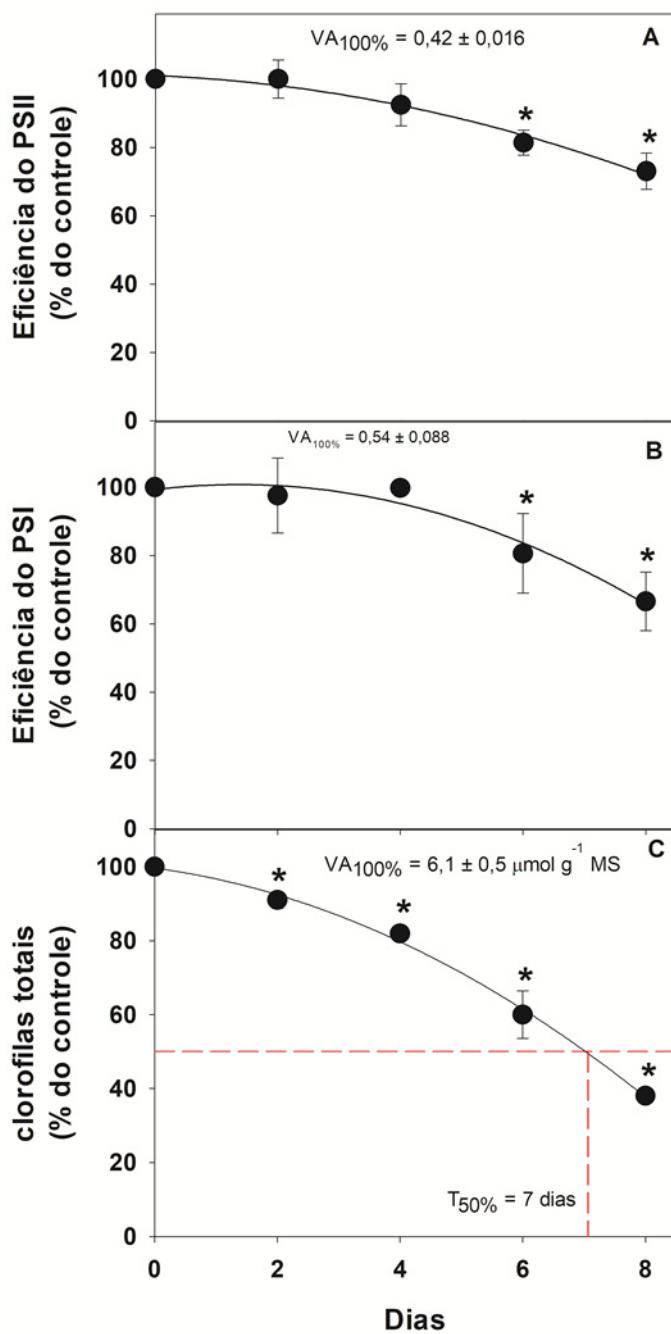


Figura 10. Mudanças na (A) eficiência do PSII, (B) eficiência do PSI e (C) clorofilas totais em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- ($0 \text{ mM } \text{NO}_3^-$) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle ($10 \text{ mM } \text{NO}_3^-$). O valor absoluto ($VA_{100\%}$) representa a média \pm DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. $T_{50\%}$ representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t ($p < 0,05$).

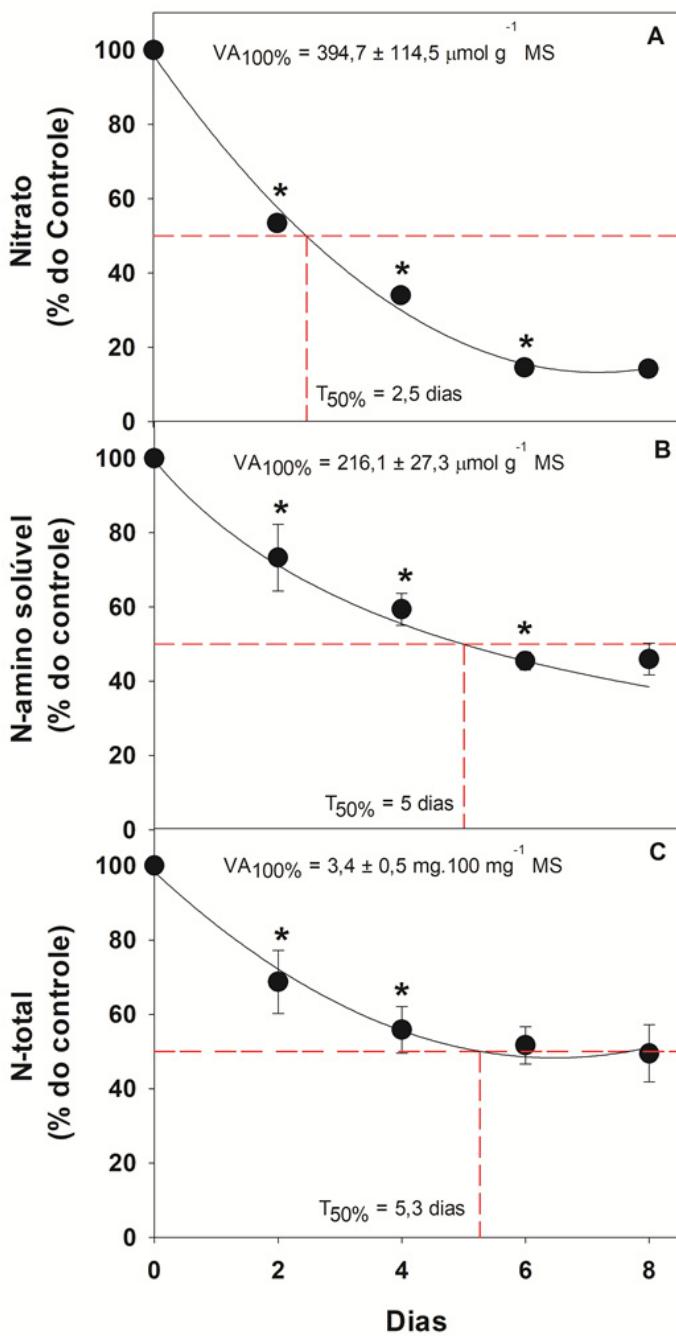


Figura 11. Mudanças na concentração de (A) nitrato, (B) N-amino solúvel e (C) nitrogênio total em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- (0 mM NO_3^-) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle (10 mM NO_3^-). O valor absoluto (VA_{100%}) representa a média ± DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. T_{50%} representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t ($p < 0,05$).

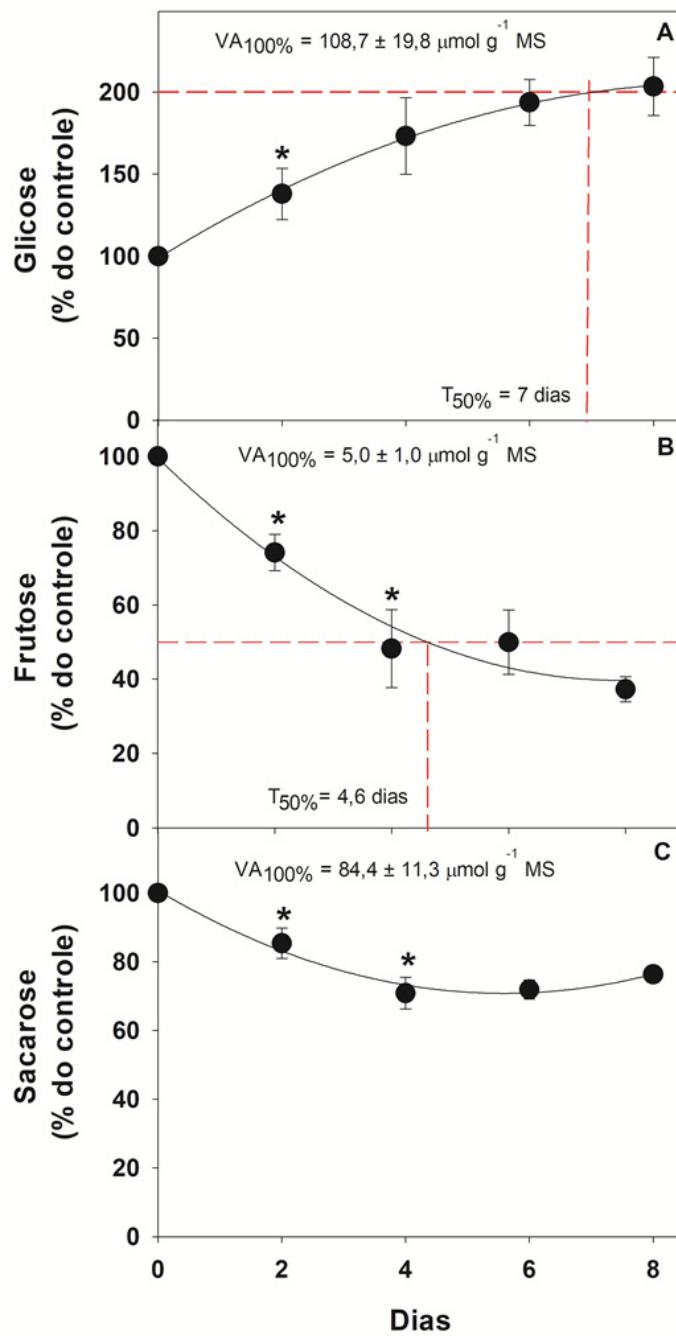


Figura 12. Mudanças na concentração de (A) glicose, (B) frutose e (C) sacarose em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- (0 mM NO_3^-) durante 8 dias. Os valores relativos são em relação ao seu respectivo controle (10 mM NO_3^-). O valor absoluto (VA_{100%}) representa a média \pm DP das médias dos cinco períodos de avaliação do controle. T_{50%} representa o tempo necessário para que o valor da variável dobre ou caia pela metade em relação ao controle. Os * representam diferenças significativas entre as médias de 3 repetições dos valores relativos entre os dias subsequentes pelo teste t ($p < 0,05$).

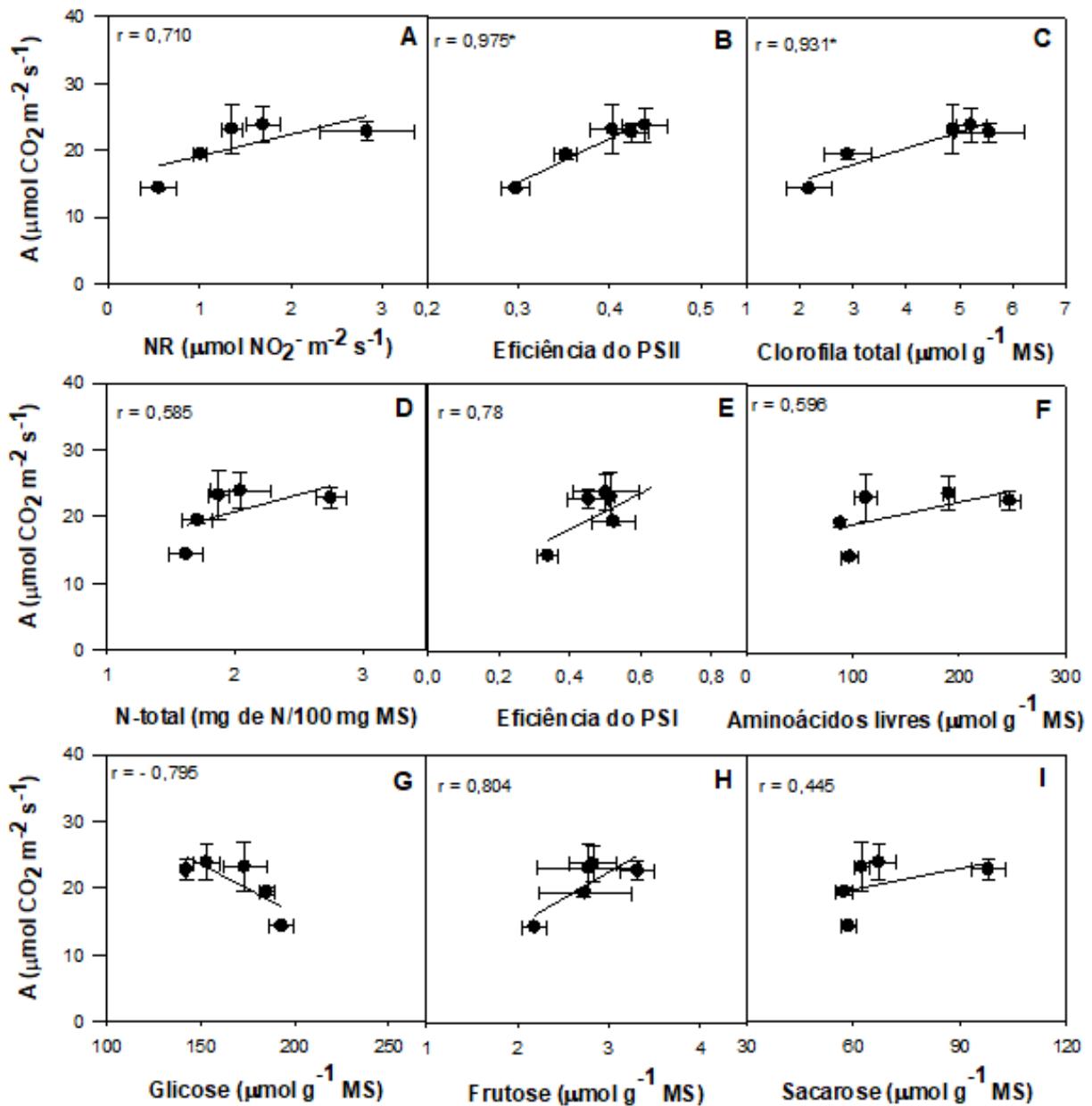


Figura 13. Correlação entre (A) Assimilação de CO_2 – A e atividade da redutase de nitrato – NR, (B) A e eficiência do PSII, (C) A e clorofila total, (D) A e nitrogênio total, (E) A e PSI, (F) A e aminoácidos livres, (G) A e glicose, (H) A e frutose e (I) A e sacarose em folhas de plantas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- ($0 \text{ mM } \text{NO}_3^-$) durante 8 dias. O valor de r indica o coeficiente de correlação de Pearson enquanto que * indica que existe significância para $p \leq 0,05$.

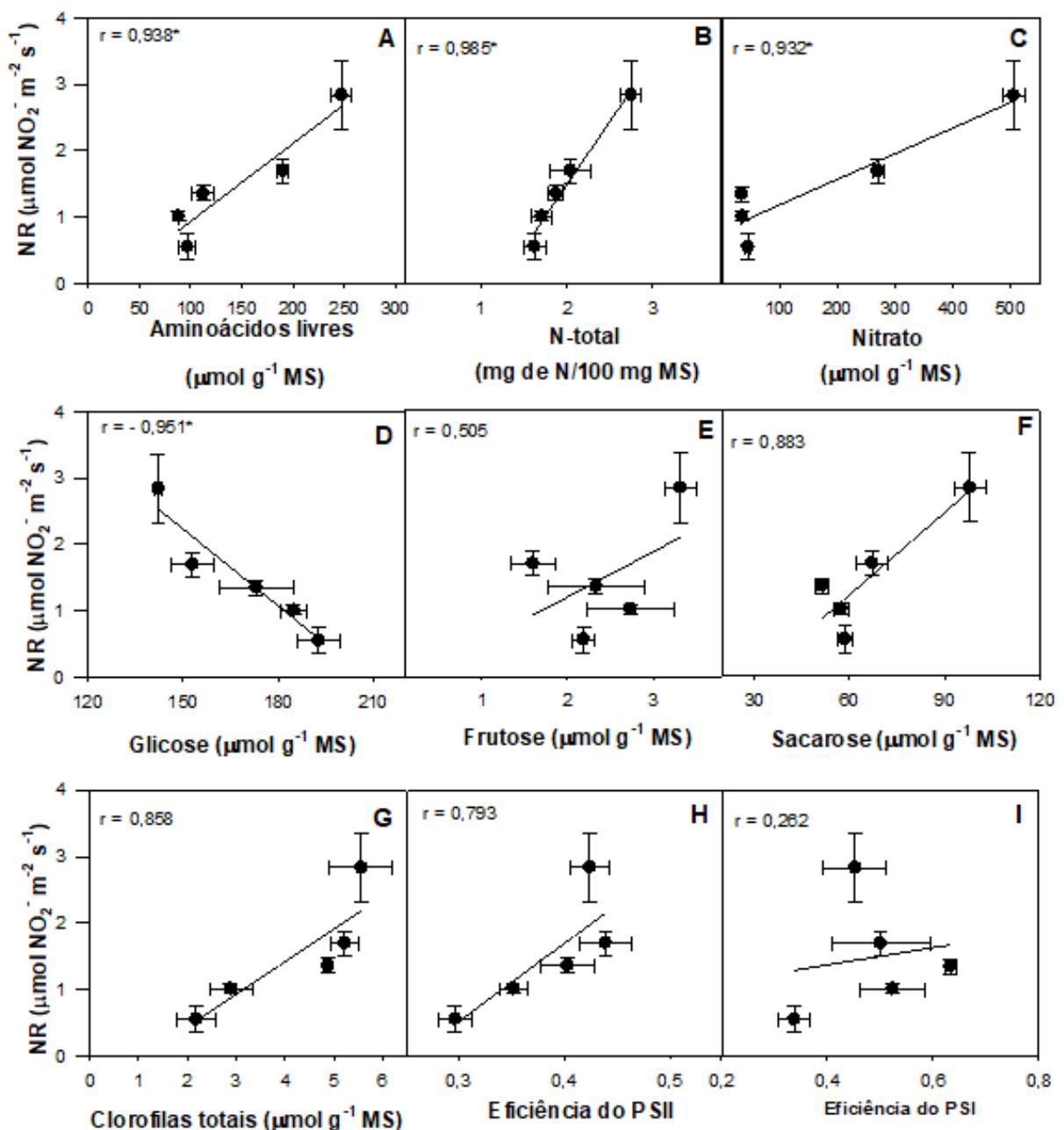


Figura 14. Correlação entre (A) Atividade de redutase de nitrato – NR e aminoácidos livres, (B) NR e nitrogênio total, (C) NR e nitrato, (D) NR e glicose, (E) NR e frutose, (F) NR e sacarose, (G) NR e clorofila total, (H) NR e eficiência do PSII e (I) eficiência do PSI em folhas de algodoeiro expostas a deprivação de NO_3^- (DN = 0 mM NO_3^-) durante 8 dias. O valor de r indica o coeficiente de correlação de Pearson enquanto que * indica que existe significância $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstrou-se, inicialmente, que a imposição progressiva de depravação de N (na forma de nitrato) no meio radicular de plantas jovens de algodoeiro, durante oito dias, induziu um paulatino decréscimo no ganho de biomassa em raízes e parte aérea (Fig. 7). Após esse período, as raízes e parte aérea das plantas supridas com elevado nível de N (NO_3^- 10 mM) – controle, apresentaram um incremento na massa seca de aproximadamente 4 e 6 vezes, respectivamente, comparadas o valor inicial (tempo zero). Nesse mesmo intervalo, as plantas cultivadas na ausência de nitrato apresentaram reduções de 15% e 41%, respectivamente, comparadas com o controle. É importante frisar que as plantas com depravação de nitrato foram previamente cultivadas com nível elevado de nitrato por 8 dias, como pode ser atestado pelo elevado conteúdo de N-total nas folhas no tempo zero (%N = 3,4 %).

As plantas sob supressão de N iniciaram o tratamento com níveis elevados desse nutriente em seus tecidos (“alimentação de luxo”), indicada pelos valores elevados de N-total nas folhas os quais estão acima do nível crítico sugerido para algodoeiro (READ *et al.*, 2006). De fato, essa espécie vegetal apresenta grande capacidade para acumular N nas suas folhas como pode ser indicadas pelas elevadas concentrações em plantas supridas com excesso de nitrogênio (MELLO *et al.*, 1958). Outros estudos indicam que o inicio da deficiência de N inicia com concentrações de N-total nas folhas próximas a 2,5% (READ *et al.*, 2006). Portanto, neste estudo foi imposto uma depravação progressiva de N, iniciando com excesso até o estabelecimento da deficiência de N aos 8 dias (%N = 2,0 %). Dessa forma, foi possível monitorar ao longo do estabelecimento da deficiência mudanças fisiológicas importantes tais como assimilação de nitrato, fotossíntese e metabolismo de açúcares.

Como reportado na literatura (CORUZZI E BUSH, 2001; KUSANO *et al.*, 2011; FAN *et al.*, 2009; KRAPP *et al.*, 2011; PAUL E DRISCOLL, 1997), a depravação de N seguida pela sua deficiência, induz diversas alterações metabólicas e fisiológicas nas plantas, acarretando vários distúrbios e redução no crescimento. Entretanto, pouco é conhecido sobre quais processos fisiológicos são mais precocemente afetados pela carência desse nutriente. Neste estudo, a depravação de nitrato induziu alterações de perca ou ganho de 50% do valor em relação ao controle na seguinte ordem nos parâmetros relacionados com a nutrição nitrogenada: conteúdo de NO_3^- > atividade de RN > concentração de frutose > conteúdo de aminoácidos livres > conteúdo de N-total > conteúdo de clorofilas totais > concentração de glicose. Interessantemente, os parâmetros relacionados com a eficiência da fotossíntese (assimilação de CO_2 e eficiência fotoquímica), além da concentração de sacarose, foram os menos afetados durante o período de depravação de nitrato e de deficiência de N em

algodoeiro.

Os resultados deste trabalho reforçam que o status de N na planta é fortemente dependente do suprimento de NO_3^- externo o qual repercute diretamente na atividade de redutase de nitrato (SILVEIRA *et al.*, 2001a; SILVEIRA *et al.*, 2001b). Por sua vez, a interrupção nesse suprimento acarreta distúrbios generalizados, afetando a fotossíntese (ARAGÃO *et al.*, 2012). Interessante que neste estudo a eficiência fotossintética foi pouco afetada pela deprivação de nitrato, decrescendo somente após 6 dias quando a deficiência de N foi estabelecida. Uma provável explicação seria que as plantas iniciaram a deprivação com alto nível de reserva de N representado por proteínas de armazenamento em órgãos vegetativos tais como Rubisco e nitrato em vacúolos (CURATTI *et al.*, 2006; FEIJÃO *et al.*, 2013). Portanto, os indicadores que decresceram mais precocemente e intensamente foram aqueles diretamente relacionados com o suprimento de nitrato: atividade de RN, nitrato, aminoácidos livres e N-total.

A redutase de nitrato é a enzima limitante para a conversão de nitrato até aminoácidos e ela é fortemente dependente do fluxo de NO_3^- o qual é essencial para sua expressão e atividade (FERRARIO-MÉRY *et al.*, 1998; KAISER E HUBER, 1994). Assim, fica explicado a intensa queda nesses três indicadores assim como a forte correlação positiva entre os mesmos e com o N-total nas folhas (Figura 14). Como largamente reportado na literatura (CORUZZI E BUSH, 2001; KUSANO *et al.*, 2011), a deficiência de N afetou a morfo-fisiologia das plantas, induzindo aumento na relação raiz/parte aérea devido a mudanças na partição de biomassa, no sexto dia de deprivação. Nesse ponto, o conteúdo de N-total nas folhas foi de 2.12%; portanto, indicando uma deficiência instalada já com redução na eficiência fotossintética. Interessante, a eficiência fotossintética de uso do N se manteve inalterada até este período (Figura 9C), sugerindo ser um período inicial de deficiência.

Esses resultados evidenciam que plantas jovens de algodoeiro possuem alta plasticidade fenotípica de uso de N ou eficiência para a fotossíntese, isto é, são capazes de realizar taxas elevadas de assimilação de CO_2 com concentrações baixas. Essa alta eficiência também existe para o uso das clorofitas (Figura 9A) diferentemente da atividade de RN a qual foi fortemente dependente dos níveis de clorofitas (Figura 9B). Esses resultados não são esperados haja vista a forte dependência funcional da fotossíntese em relação às clorofitas (ASHRAF & HARRIS, 2013; WITTENBACH *et al.*, 1979, CAMP *et al.* 1982). Essas respostas corroboram que, de fato, o alto suprimento inicial de nitrato induziu aumento nas reservas e produtos originados da assimilação de nitrato, incluindo metabólitos tais como alguns aminoácidos que são precursores da síntese de clorofitas (ECCLES e HONIG, 1983; KAISER E FOSTER 1989; FOYER E FERRARIO 1994) repercutindo em altos níveis desses pigmentos.

Os resultados deste trabalho evidenciam que os melhores marcadores para indicar o “status” de N nas folhas (nitrato, aminoácidos, N-total e clorofilas) não foram necessariamente os melhores para indicar distúrbios fisiológicos importantes tais como na fotossíntese. Em outras palavras, esses compostos respondem positivamente ao suprimento de nitrato, mas suas acumulações nos tecidos foliares não induzem linearmente modificações na fotossíntese e crescimento. Portanto, esse descompasso dificulta encontrar marcadores mais efetivos para indicar o estado nutricional de N, mais precisamente o nível crítico desse nutriente – concentração acima da qual o crescimento permanece inalterado (READ *et al.*, 2006). Além disso, o conteúdo de N-total – o indicador comumente utilizado na agronomia se mostrou pouco sensível para indicar precocemente distúrbios na fotossíntese.

A limitação deste estudo é que inicialmente as plantas foram supridas com nível elevado de N, gerando alto nível de reservas nitrogenadas nos seus tecidos. Seria necessário associar o estudo tempo-dependente com um dose-dependente para estabelecer relações mais seguras entre indicadores precoces de deficiência e distúrbios fisiológicos relevantes. De qualquer maneira, na literatura existem poucos ou talvez nenhum relato mostrando uma independência entre nutrição nitrogenada e fotossíntese. O mesmo deve ser verdade para as relações entre “status” de N, nível de clorofilas e fotossíntese em plantas cultivadas. Portanto, estudos desse tipo são importantes para compreender melhor a dinâmica da deficiência de N, passando pelas fases de depravação de nitrato no meio externo, fase de mobilização de reservas, deficiência incipiente, deficiência instalada e deficiência aguda.

6. CONCLUSÕES

Plantas jovens de algodoeiro, previamente supridas com nível elevado de nitrato, são capazes de mobilizar reservas nitrogenadas preferencialmente para o crescimento de raízes em detrimento da parte aérea durante uma deprivação de N. Nessa fase, existe uma positiva e significativa correlação entre assimilação de nitrato pela RN, acumulação de N-total, clorofilas e glicose nas folhas. Entretanto, não existe uma correlação significativa entre esses indicadores e a eficiência fotossintética representada pela assimilação de CO₂ e atividade fotoquímica. Esse descompasso é causado pelo alto acúmulo de N nos tecidos e armazenamento de reservas de compostos nitrogenados nas fases iniciais da deprivação de N. Postula-se que uma forte correlação entre assimilação de nitrato, fotossíntese e clorofilas deve ocorrer somente na fase de deficiência aguda de N, quando todos esses parâmetros se encontram em níveis críticos. Esse estudo também sugere que as clorofilas, assim como algumas proteínas, são acumuladas em excesso na fase de suprimento de alto nível de nitrato para serem mobilizadas durante a fase de deficiência aguda de N.

REFERÊNCIAS

- ALBORESI, A. *et al.* Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 4, p. 500-512, 2005.
- ALVAREZ, José M.; VIDAL, Elena A.; GUTIÉRREZ, Rodrigo A. Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses. **Current opinion in plant biology**, v. 15, n. 2, p. 185-191, 2012.
- ARAGÃO, Rafael M. et al. High supply of NO₃⁻ mitigates salinity effects through an enhancement in the efficiency of photosystem II and CO₂ assimilation in *Jatropha curcas* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 6, p. 2135-2143, 2012.
- ASHRAF, MHPJC; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.
- BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and Plant Kjeldahl digest. **Community Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, n. 9 - 10, p. 961 – 969, 1989.
- BLOOM, Arnold J. *et al.* Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. **Plant Physiology**, v. 91, n. 1, p. 352-356, 1989.
- BLOOM, Arnold J. Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. **Photosynthesis Research**, v. 123, n. 2, p. 117-128, 2015.
- BOYER, John S. Advances in drought tolerance in plants. **Advances in agronomy**, v. 56, p. 187-219, 1996.
- BRADOW, J. M. *et al.* Site-specific management of cotton fiber quality. In: **Precision Agriculture'99, Proceedings of the Second European Conference on Precision Agriculture. Odense, Denmark**. 1999. p. 11-15.
- CAMP, Pamela J. *et al.* Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves: I. Basis for the reduction of photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 70, n. 6, p. 1641-1646, 1982.
- CAMPBELL, John Y.; COCHRANE, John H. By force of habit: A consumption-based explanation of aggregate stock market behavior. **Journal of political Economy**, v. 107, n. 2, p. 205-251, 1999.
- CASSMAN, Kenneth G. (Ed.). **Breaking the yield barrier: Proceedings of a workshop on rice yield potential in favorable environments, IRRI, 29 November-4 December 1993**. Int. Rice Res. Inst., 1994.
- CATALDO, J. M.; HAROOM, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue. **Commun. Soil Science and Plant Analysis**, v.6, n.1, p.71-80, 1975.
- CHAMIZO-AMPUDIA, Alejandro *et al.* Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. **Trends in plant science**, v. 22, n. 2, p. 163-174, 2017.
- CHAMPIGNY, Marie Louise. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. **Photosynthesis Research**, v. 46, n. 1-2, p. 117-127, 1995.

CHENG, Chi-Lien et al. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1861-1864, 1992.

CHIOU, Tzyy-Jen; BUSH, Daniel R. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4784-4788, 1998.

CORUZZI, Gloria M. Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, v. 2, 2003.

CORUZZI, Gloria; BUSH, Daniel R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 61-64, 2001.

CORUZZI, Gloria M.; ZHOU, Li. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging ‘matrix effects’. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 3, p. 247-253, 2001.

CRAWFORD, N. M. Nitrogen and sulfur. **Biochemistry & molecular biology of plants**, 2000.

CURATTI, Leonardo; GIARROCCO, Laura; SALERNO, Graciela L. Sucrose synthase and RuBisCo expression is similarly regulated by the nitrogen source in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. **Planta**, v. 223, n. 5, p. 891-900, 2006.

DAVIDONIS, Gayle H. et al. Cotton fiber quality is related to boll location and planting date. **Agronomy Journal**, v. 96, n. 1, p. 42-47, 2004.

DE SANTANA, J. C. F.; WANDERLEY, Maurício José R.; BELTRÃO, NE de M. Tecnologia da fibra e do fio do algodão, análises e interpretações dos resultados. **Embrapa Agropecuária Oeste-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 1998.

DENNIS, D. T. Carbohydrate metabolism. **Biochemistry & molecular biology of plants**, 2000.

DIAZ, Céline et al. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v. 147, n. 3, p. 1437-1449, 2008.

ECCLES, Joseph; HONIG, Barry. Charged amino acids as spectroscopic determinants for chlorophyll in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 16, p. 4959-4962, 1983.

FAN, Shu-Chun et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1. 7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, v. 21, n. 9, p. 2750-2761, 2009.

FEIJÃO, Alexciane Rodrigues et al. Nitrate modulates the contents of chloride and N-compounds in maize plants under salinity. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 10-19, 2013.

FERRARIO-MÉRY, Sylvie; VALADIER, Marie-Hélène; FOYER, Christine H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Physiology**, v. 117, n. 1, p. 293-302, 1998.

- FICHTNER, K.; SCHULZE, E.-D. The effect of nitrogen nutrition on growth and biomass partitioning of annual plants originating from habitats of different nitrogen availability. **Oecologia**, v. 92, n. 2, p. 236-241, 1992.
- FLEXAS, Jaume *et al.* Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 10, p. 1284-1298, 2008.
- FORDE, Brian G.; WALCH-LIU, P. I. A. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 682-693, 2009.
- FOYER, Christine H. *et al.* Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic Nicotiana plumbaginifolia plants to changes in nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, v. 104, n. 1, p. 171-178, 1994.
- FOYER, Christine H.; FERRARIO, Sylvie. Modulation of carbon and nitrogen metabolism in transgenic plants with a view to improved biomass production. 1994.
- GUO, Fang-Qing; WANG, Rongchen; CRAWFORD, Nigel M. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1. 1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 835-844, 2002.
- GRUBER, Nicolas; GALLOWAY, James N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293, 2008.
- G.S. Khush, S. Peng, in: M.P. Reynolds, S. Rajaram, A. McNab (Eds.), **Increasing Yield Potential in Wheat: Breaking the Barriers, International Maize and Wheat Improvement Center, Batan Mexico**, 1996, pp. 36–51
- GUTIÉRREZ, Rodrigo A. *et al.* Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in Arabidopsis. **Genome biology**, v. 8, n. 1, p. R7, 2007.
- HERMANS, Christian *et al.* How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation?. **Trends in plant science**, v. 11, n. 12, p. 610-617, 2006.
- HINSINGER, Philippe *et al.* P for two, sharing a scarce resource-soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. **Plant Physiology**, p. pp. 111.175331, 2011.
- HIRABAYASHI, J. On the origin of elementary hexoses. **The Quarterly review of biology**, v. 71, n. 3, p. 365-380, 1996.
- HIROSE, Naoya *et al.* Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 75-83, 2007.
- HOFSTRA, Rinie; LANTING, Lineke; DE VISSER, Ries. Metabolism of Urtica dioica as dependent on the supply of mineral nutrients. **Physiologia Plantarum**, v. 63, n. 1, p. 13-18, 1985.
- JIANG, G. M. *et al.* Chain correlation between variables of gas exchange and yield potential in different winter wheat cultivars. **Photosynthetica**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2000.

- JIANG, Hua et al. Comparison of some photosynthetic characters between two hybrid rice combinations differing in yield potential. **Photosynthetica**, v. 40, n. 1, p. 133-137, 2002.
- JOURNET, Etienne-Pascal; BLIGNY, Richard; DOUCE, R. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 7, p. 3193-3199, 1986.
- KAISER, Werner M.; SPILL, Dirk. Rapid Modulation of Spinach Leaf Nitrate Reductase by Photosynthesis: II. In Vitro Modulation by ATP and AMP. **Plant physiology**, v. 96, n. 2, p. 368-375, 1991.
- KAISER, Werner M.; HUBER, Steven C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, v. 106, n. 3, p. 817, 1994.
- KAISER, Werner M.; FÖRSTER, Jutta. Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. **Plant Physiology**, v. 91, n. 3, p. 970-974, 1989.
- KANECHI, Micho et al. Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. **Plant and cell physiology**, v. 37, n. 4, p. 455-460, 1996.
- KOCH, Karen. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.
- KOZLOWSKI, Theodore T.; PALLARDY, Stephen G.; POSPISILOVA, J. Physiology of woody plants. **Biologia plantarum**, v. 40, n. 2, p. 168-168, 1997.
- KRAPPP, Anne et al. Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation pattern towards N starvation. **Plant Physiology**, p. pp. 111.179838, 2011.
- KRAPPP, Anne et al. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 3, p. 789-798, 2014.
- KROUK, Gabriel et al. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 3, p. 265-272, 2010.
- KUSANO, Miyako et al. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1439-1453, 2011.
- LAM, H.-M. et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 569-593, 1996.
- LAMAZE, Thierry et al. Short-term effects of nitrate on sucrose synthesis in wheat leaves. **Planta**, v. 185, n. 1, p. 53-57, 1991.
- LAWLOR, D.W. Photosynthesis 3rd Ed. **Scientific Publishers Limited, Oxford**, 2001.
- LAWLOR, D. W. The effects of water deficit on photosynthesis. **Environment and Plant Metabolism**, p. 129-160, 1995.
- LEA, Peter John; IRELAND, Robert J. **Nitrogen metabolism in higher plants**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1999.

- LE DEUNFF, Erwan; MLAGOLI, Philippe. An updated model for nitrate uptake modelling in plants. I. Functional component: cross-combination of flow-force interpretation of nitrate uptake isotherms, and environmental and in planta regulation of nitrate influx. **Annals of botany**, v. 113, n. 6, p. 991-1005, 2014.
- LI, Wenbin *et al.* Dissection of the AtNRT2. 1: AtNRT2. 2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant physiology**, v. 143, n. 1, p. 425-433, 2007.
- LIU, Lai-Hua *et al.* AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 15, n. 3, p. 790-800, 2003.
- MALKIN, R.; NIYOGI, K. Photosynthesis ages. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, p. 413-429, 2000.
- MANN, Charles C. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis. 1999.
- MILLER, Anthony J. *et al.* Nitrate transport and signalling. **Journal of experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297-2306, 2007.
- MILLER, Anthony J. *et al.* Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 1, p. 111-119, 2008.
- NOCTOR, Graham; FOYER, Christine H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual review of plant biology**, v. 49, n. 1, p. 249-279, 1998.
- PARRY, Martin AJ *et al.* Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 3, p. 717-730, 2012.
- PAUL, M. J.; DRISCOLL, S. P. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source: sink imbalance. **Plant, cell & environment**, v. 20, n. 1, p. 110-116, 1997.
- PEOPLES, M. B., FAIZAH, A. W., REAKASEM, B. e HERRIDGE, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. **Australian Centre for International Agricultural Research Canberra**. p. 76. 1989.
- PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384-394, 1989.
- RAMEY JR, Harmon H. Stress influences on fiber development. **Cotton physiology**, n. 1, p. 351-359, 1986.
- READ, John J.; REDDY, K. Raja; JENKINS, Johnie N. Yield and fiber quality of upland cotton as influenced by nitrogen and potassium nutrition. **European Journal of Agronomy**, v. 24, n. 3, p. 282-290, 2006.
- REDDY, K. Raja *et al.* Temperature regime and carbon dioxide enrichment alter cotton boll development and fiber properties. **Agronomy Journal**, v. 91, n. 5, p. 851-858, 1999.

- REDDY, K. Raja *et al.* Interactive effects of carbon dioxide and nitrogen nutrition on cotton growth, development, yield, and fiber quality. **Agronomy Journal**, v. 96, n. 4, p. 1148-1157, 2004.
- REMANS, Tony *et al.* The Arabidopsis NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 50, p. 19206-19211, 2006.
- ROITSCH, Thomas. Source-sink regulation by sugar and stress. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 3, p. 198-206, 1999.
- SAGE, Rowan F. Variation in the k cat of Rubisco in C3 and C4 plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 369, p. 609-620, 2002.
- SALERNO, Graciela L.; CURATTI, Leonardo. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why?. **Trends in plant science**, v. 8, n. 2, p. 63-69, 2003.
- SANZ-LUQUE, Emanuel *et al.* THB 1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. **The Plant Journal**, v. 81, n. 3, p. 467-479, 2015.
- SCHACHTMAN, Daniel P.; SHIN, Ryoung. Nutrient sensing and signaling: NPKS. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 47-69, 2007.
- SCHREIBER, U. B. W. N.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: **Ecophysiology of photosynthesis**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1995. p. 49-70.
- SCHEIBLE, Wolf-Rüdiger *et al.* Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. **Plant physiology**, v. 136, n. 1, p. 2483-2499, 2004.
- SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, n. 1, p. 37-46, 2001.
- SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2001.
- SOLOMONSON, Larry P.; BARBER, Michael J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual review of plant biology**, v. 41, n. 1, p. 225-253, 1990.
- TSAY, Yi-Fang *et al.* Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS letters**, v. 581, n. 12, p. 2290-2300, 2007.
- STITT, Mark *et al.* Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 370, p. 959-970, 2002.
- STITT, Mark; LUNN, John; USADEL, Björn. *Arabidopsis* and primary photosynthetic metabolism—more than the icing on the cake. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 1067-1091, 2010.

- STITT, M.; SCHULZE, D. Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. **Plant, Cell & Environment**, v. 17, n. 5, p. 465-487, 1994.
- SUN, Jiali et al. Nitrogen can improve the rapid response of photosynthesis to changing irradiance in rice (*Oryza sativa L.*) plants. **Scientific reports**, v. 6, p. 31305, 2016.
- TABUCHI, Mayumi; ABIKO, Tomomi; YAMAYA, Tomoyuki. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa L.*). **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 9, p. 2319-2327, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology 5th Ed. **Sunderland, MA: Sinauer Associates**, 2010.
- TERCÉ-LAFORGUE, Thérèse; MÄCK, Gisela; HIREL, Bertrand. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 2, p. 220-228, 2004.
- THUM, Karen E. et al. Light-and carbon-signaling pathways. Modeling circuits of interactions. **Plant physiology**, v. 132, n. 2, p. 440-452, 2003.
- URBANCZYK-WOCHNIAK, Ewa; FERNIE, Alisdair R. Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 309-321, 2004.
- VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 280-283, 1968.
- VIDAL, Elena A.; GUTIERREZ, Rodrigo A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 5, p. 521-529, 2008.
- VINCENTZ, Michel et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **The Plant Journal**, v. 3, n. 2, p. 315-324, 1993.
- XU, Guohua; FAN, Xiaorong; MILLER, Anthony J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 153-182, 2012.
- YAMAYA, Tomoyuki; OAKS, Ann. Metabolic regulation of ammonium uptake and assimilation. In: **Nitrogen Acquisition and assimilation in higher plants**. Springer, Dordrecht, 2004. p. 35-63.
- YING, Jifeng et al. Comparison of high-yield rice in tropical and subtropical environments: I. Determinants of grain and dry matter yields. **Field Crops Research**, v. 57, n. 1, p. 71-84, 1998.
- YU, Su-May. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. **Plant Physiology**, v. 121, n. 3, p. 687-693, 1999.

W. PATRICK, John; C. BOTHA, Frikkie; G. BIRCH, Robert. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. **Plant biotechnology journal**, v. 11, n. 2, p. 142-156, 2013.

WARING, R. H. et al. Differences in chemical composition of plants grown at constant relative growth rates with stable mineral nutrition. **Oecologia**, v. 66, n. 2, p. 157-160, 1985.

WELFARE, Karen; YEO, Anthony R.; FLOWERS, Timothy J. Effects of salinity and ozone, individually and in combination, on the growth and ion contents of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. **Environmental Pollution**, v. 120, n. 2, p. 397-403, 2002.

ZHANG, Xin *et al.* Managing nitrogen for sustainable development. **Nature**, v. 528, n. 7580, p. 51, 2015.

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

APÊNDICE A

Figura 1. Características morfológicas de plantas de algodão cultivadas em condições de casa de vegetação com 22 dias de idade sob (A) vista superior e (B) vista lateral.

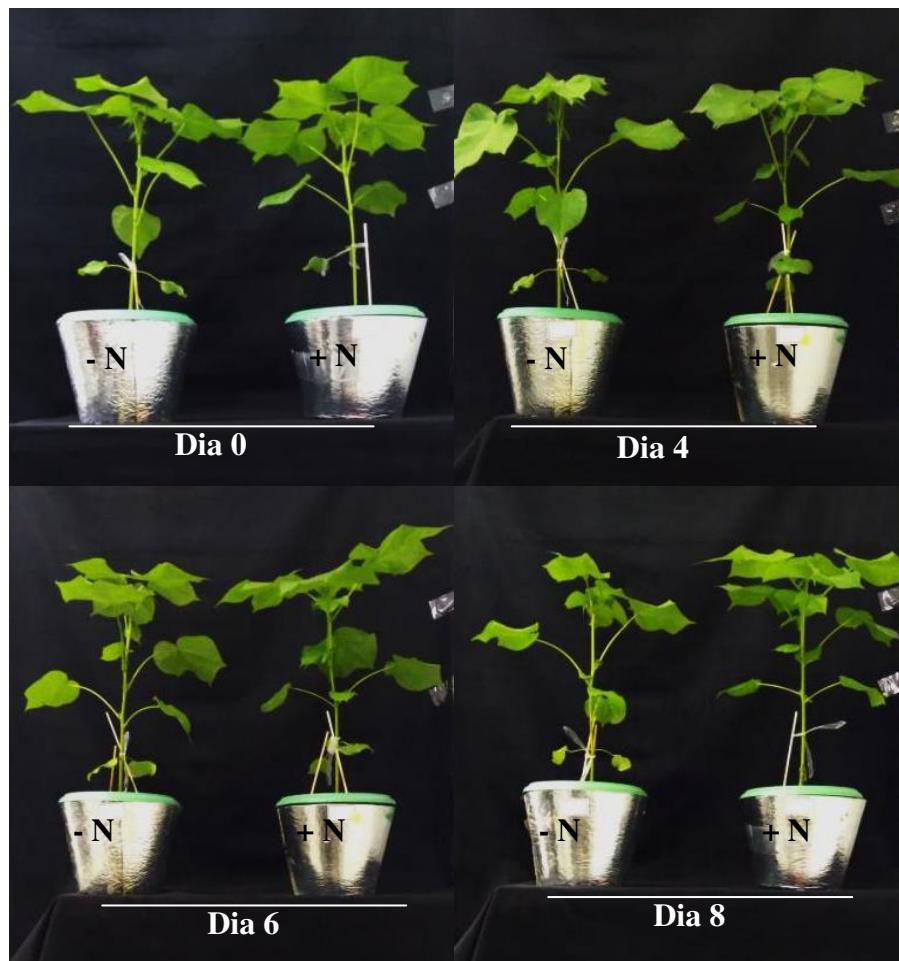


Figura 2. Características morfológicas de plantas de algodoeiro cultivadas em casa de vegetação expostas ao tratamento de alto nível de nitrato ($10 \text{ mM } \text{NO}_3^-$, +N) ou deprivação de nitrato ($0 \text{ mM } \text{NO}_3^-$, -N) durante 8 dias.