



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO SOLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA- SOLOS E NUTRIÇÃO DE
PLANTAS**

ANTONIO GLAYDSON DE SOUSA FEITOSA

**MODULAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE E ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO POR
CONDIÇÕES DE ELEVADO CO₂ ATMOSFÉRICO EM PLANTAS DE SOJA**

FORTALEZA

2014

ANTONIO GLAYDSON DE SOUSA FEITOSA

**MODULAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE E ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO POR
CONDIÇÕES DE ELEVADO CO₂ ATMOSFÉRICO EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio
Gomes da Silveira

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F336a Feitosa, Antonio Glaydson de Sousa.
Modulação da fotossíntese e assimilação do nitrogênio por condições de elevado CO₂ atmosférico em plantas de soja / Antonio Glaydson de Sousa Feitosa. – 2014.
71 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências do Solo, Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Fisiologia da Nutrição de Plantas.
Orientação: Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira.
1. Soja. 2. Assimilação de nitrogênio. 3. Fotossíntese. I. Título.

CDD 631.4

ANTONIO GLAYDSON DE SOUSA FEITOSA

**MODULAÇÃO DA FOTOSÍNTESE E ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO POR
CONDIÇÕES DE ELEVADO CO₂ ATMOSFÉRICO EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

Aprovada em 16/07/2014

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Milton Costa Lima Neto
PDJ/CNPq

Dr. Rafael Magalhães de Aragão
PNPD/CAPES

A Deus.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, onde realizei este curso e por ter disponibilizado suas dependências.

Ao Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, ao qual dediquei parte da minha vida e guardarei boas lembranças.

Ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por ceder o espaço físico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, pela orientação e acolhimento na sua equipe de trabalho.

Ao Dr. Marcio de Oliveira Martins, pela colaboração nas análises bioquímicas.

Ao Dr. Milton Costa Lima Neto, pelo auxílio na confecção deste trabalho.

Ao Dr. Rafael Magalhães de Aragão, pela colaboração científica nos experimentos.

Aos amigos Jamyla, Jones, Yugo, Jordânia, Petterson, Girlaine, Cinthya, Adilton, Fabrício, João Vitor, Juliana, Lara, Rachel, Sergio, Tatiana, Ana Karla e Karol pelo companheirismo, amizade e preciosa ajuda durante todo o período do mestrado.

A minha família por me acompanhar e dar suporte durante esse período.

A Deus, por sempre estar presente comigo.

RESUMO

Altas concentrações de CO₂ atmosférico limitam a assimilação de CO₂ e de nitrogênio em muitas espécies de plantas C3. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar como o elevado CO₂ regula a fotossíntese e a assimilação do nitrogênio em plantas de soja. Para tanto, foi realizado um experimento em câmara de crescimento utilizando plantas de soja com 25 dias de idade. Os níveis de CO₂ aplicados foram: ambiente (40 Pa), elevado (100 Pa) e transição para as condições ambiente (100 – 40 Pa). O elevado CO₂ foi capaz de afetar fortemente as trocas gasosas, com fechamento estomático, levando a fortes reduções na transpiração foliar (88%) e assimilação de CO₂ (48%). Recuperando 69% do valor inicial da fotossíntese líquida após o período de transição para a condição ambiente. Entretanto, a concentração interna de CO₂ (C_i) foi elevada em 1,7 vezes, retornando para o nível de controle após a transição. A atividade inicial e a total da Rubisco decresceram 44% e 34%, respectivamente. Levando a uma redução de 9% no estado de ativação da enzima, porém após a transição para as condições de CO₂ ambiente, a atividade inicial e a total recuperaram 74% e 84%, respectivamente. Já a redutase do nitrato apresentou uma forte inibição ao longo desse período quando comparada com a condição ambiente, chegando a uma redução máxima de 64% após quatro dias de exposição ao elevado CO₂. Contrariamente, esta enzima teve sua capacidade inicial recuperada em 90% após o período de transição. Em conclusão, podemos afirmar que a fotossíntese e a atividade da redutase do nitrato são praticamente inibidas por elevado CO₂ atmosférico, controladas principalmente por limitações estomáticas e metabólicas.

Palavras-chave: *Glycine max* L. Assimilação de carbono. Assimilação do nitrogênio. Metabolismo do nitrogênio. Interação C-N.

ABSTRACT

Elevated concentrations of atmospheric CO₂ may limit growth and vegetative development of many species. Therefore, the present study aimed to identify how the elevated CO₂ negatively regulates photosynthesis and nitrate reduction in soybean plants. For this, an experiment was conducted in growth chamber utilizing 25-days-old soybean plants. The CO₂ levels applied were: ambient (40 Pa), elevated (100 Pa) and transition to ambient conditions (100 – 40 Pa). The elevated CO₂ strongly impaired gas exchange, inducing the stomatal closure, leading to strong reductions in leaf transpiration (88%) and CO₂ assimilation (48%), recovering 69% of net photosynthesis after the transition period. However, the partial pressure of CO₂ was elevated at 1.7 times, recovering to the control level after transition. The total and initial Rubisco activity decreased 34% and 44%, respectively, when exposed for 4 days at elevated CO₂, reducing the activation state of enzyme by 9%. However, after the transition to ambient CO₂, the total and initial activity recovered 84% and 74%, respectively. Nitrate reductase showed a strong inhibition during this period when compared with control condition, reaching a maximum reduction of 64% after four days of exposure at elevated CO₂. In contrast, after the transition period to ambient conditions, the activity of this enzyme was recovered by 90% of its initial capacity. In conclusion, we can affirm that nitrate reductase and photosynthetic activity are almost inhibited under conditions of elevated CO₂, mainly due to stomatal control and metabolic limitations.

Keywords: *Glycine max* L. Carbon assimilation. Nitrogen assimilation. Nitrogen metabolism. C-N interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Esquema de Ellsworth mostrando a via C3 do processo de fotossíntese e suas interrelações 25
- Figura 2- Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas 27
- Figura 3- Fluxograma das condições de crescimento das plantas de soja utilizadas nas experimentações 40
- Figura 4- Comparação do crescimento entre as plantas de soja expostas a CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e transição de CO₂ (de 100 para 40 Pa(TD)) 48
- Figura 5- Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (B), condutância estomática (C) e pressão parcial de CO₂ (D) em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa) e CO₂ elevado (100 Pa). A seta indica a transição de CO₂ de 100 para 40 Pa. Cada ponto representa a média de três repetições (\pm DP) 51
- Figura 6- Curvas de assimilação de CO₂ em respostas a pressão parcial intercelular de CO₂ em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa) e elevado CO₂ (100 Pa: por dois e quatro dias). Cada ponto representa a média de três repetições (\pm DP) 53
- Figura 7- Atividade inicial (A), total (B) e estado de ativação (C) em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (0D: 40 Pa) e CO₂ elevado (4D: 100 Pa) e transição de CO₂(6D:100-40 Pa). Cada ponto representa a média de três repetições (\pm DP) 55
- Figura 8- Atividade da redutase do nitrato (A) e influxo do nitrato (B) em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa) e CO₂ elevado (100 Pa), a seta indica (dia da transição de CO₂: 100-40 Pa). Cada ponto representa a média de três repetições (\pm DP) 57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Matéria fresca total (MF Total), foliar (MF Foliar) e de raízes (MF Raízes) em plantas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para as CO₂ ambiente ((td):100-40 Pa) .
..... 49
- Tabela 2- Clorofila, carotenóides, conteúdo relativo de água (CRA) e dano de membrana (DM) em plantas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para as condições ambiente ((td):100-40 Pa) 50
- Tabela 3- Parâmetros associados com a eficiência fotossintética calculados a partir das curvas A-Ci e A-PAR em plantas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa). V_{cmax}: velocidade máxima de carboxilação; J_{max}: taxa máxima de transporte de elétrons; Ls: limitação estomática e Lm: limitação metabólica 53
- Tabela 4- Conteúdo de amido, carboidrato a sacarose em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para as condições ambiente ((td):100-40 Pa) 56
- Tabela 5- Conteúdo de nitrogênio total, nitrato, aminoácidos e proteínas solúveis em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para a condição ambiente ((td):100-40 Pa) 59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	13
2.1 Hipótese	13
2.2 Objetivo geral	13
2.3 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Aspectos gerais da soja	14
3.1.1 <i>A produção mundial de soja</i>	14
3.1.2 <i>A cultura da soja no Brasil e sua produção</i>	14
3.2 Fisiologia e desenvolvimento da soja	16
3.2.1 <i>Germinação e emergência</i>	17
3.2.2 <i>Desenvolvimento vegetativo</i>	18
3.2.3 <i>Desenvolvimento reprodutivo</i>	19
3.2.4 <i>Desenvolvimento radicular</i>	21
3.3 Fotossíntese e fotorrespiração no ciclo C ₃	22
3.4 A absorção e a assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas	26
3.5 Regulação da assimilação do nitrogênio	28
3.5.1 <i>Regulação pelas enzimas do ciclo do nitrogênio</i>	28
3.5.2 <i>Características da enzima redutase do nitrato – RN</i>	30
3.5.3 <i>Regulação da atividade da redutase do nitrato (RN)</i>	30
3.5.4 <i>Sintetase da glutamina (GS)/sintetase do glutamato (GOGAT)</i>	32
3.5.5 <i>Regulação pela disponibilidade energética</i>	33
3.6 Local de assimilação (raiz ou parte aérea)	34
3.7 Interação entre o metabolismo do carbono e o do nitrogênio	35
3.8 Plantas C ₃ submetidas a elevadas concentrações de CO ₂ : o que é conhecido atualmente	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material vegetal e condições de crescimento	39
4.2 Tratamentos e coleta do material vegetal	40
4.2.1 <i>Experimento: modulação na fotossíntese e assimilação do nitrogênio por condições de elevado CO₂</i>	40
4.3 Medidas de trocas gasosas, curvas A-Ci	41
4.4 Determinação de clorofila e carotenóides	42

4.5 Determinação do perfil de açúcares	42
4.6 Determinação das atividades enzimáticas	43
4.7 Determinação do teor de proteínas totais e aminoácidos	44
4.8 Determinação do influxo de nitrato, conteúdo de nitrato, amônio e nitrogênio total	45
4.9 Determinação do conteúdo relativo de água (CRA) e dano de membrana	45
4.10 Delineamento experimental e análises estatísticas	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* L.) é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são muito utilizados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o seu uso como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO, 2000). Segundo o levantamento da safra brasileira de grãos 2013/14, divulgado em outubro pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), as colheitas alcançaram a produção de 88,65 milhões de toneladas em 28,5 milhões de hectares cultivadas (CONAB, 2014). Entretanto, a capacidade do planeta de fornecer alimentos para uma população que pode chegar a 9.1 bilhões até 2015, vem se tornando cada vez mais discutida, uma vez que o aumento na concentração de CO₂ pode limitar consideravelmente a produção de alimentos (STO, 2011).

No início da industrialização, a concentração atmosférica de CO₂ era de apenas 280 ppm. Nos dias atuais, com o avanço da industrialização esta concentração já superou os 400 ppm. No entanto, pesquisadores acreditam que a última vez em que a concentração de CO₂ esteve acima da marca dos 400 ppm foi aproximadamente a 3,2 milhões de anos atrás, quando o planeta era muito mais quente do que hoje (ICB, 2013). Em contrapartida, as plantas podem mitigar estas mudanças através da conversão fotossintética do CO₂ atmosférico em carboidratos e outros compostos orgânicos, mas o potencial para esta conversão ainda continua incerto (BLOOM *et al.*, 2010).

Muitos estudos demonstram que incrementos na concentração atmosférica de CO₂ geralmente promovem um aumento no crescimento e produtividade das culturas, elevando a taxa fotossintética (P_N) e reduzindo a fotorrespiração em várias espécies de plantas C₃, como soja, arroz e trigo (LONG *et al.*, 2006). Este incremento, toda via, diminui ao longo do tempo, denominando um fenômeno conhecido como aclimatação ao CO₂ (REICH, 2006). Esta sub-regulação da capacidade fotossintética pode envolver decréscimos na atividade da Rubisco e no conteúdo total de nitrogênio (LONG *et al.*, 2004). Observa-se também uma redução na ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) limitando a fotossíntese em condições de saturação de CO₂ (BLOOM, 2014). A

magnitude destas respostas dependem de vários fatores, como: das espécies de plantas (ETHIER, 2008), duração da exposição ao alto CO₂ (ZHOU, 2011) e suprimento de nitrogênio (CROUS, 2008). Diminuições na condutância estomática e na transpiração também são comumente observadas em elevadas concentrações de CO₂ atmosférico (BUNCE, 2001). Adicionalmente, sabe-se que existe uma estreita correlação entre a condutância estomática e o transporte de nitrogênio nas folhas de *Nicotiana tabacum* (MOGHAIEB *et al.*, 2005).

As alterações no metabolismo do nitrogênio em resposta a elevadas concentrações de CO₂ ainda não estão perfeitamente compreendidas a nível fisiológico e bioquímico, embora seja conhecido atualmente que o nitrogênio é o principal regulador das respostas nas plantas sob altos níveis de dióxido de carbono (LUO *et al.*, 2004). Modulações na atividade da redutase do nitrato (RN) podem ser um componente importante no estudo das respostas fisiológicas ao elevado CO₂ (BLOOM, 2014) e alguns estudos têm demonstrado variações na atividade da RN sob condições de elevado CO₂ (BLOOM *et al.*, 2010; JAIN *et al.*, 2007). Atualmente tem sido demonstrado que o elevado CO₂ pode promover aumentos (MATT *et al.*, 2001), decréscimos (BLOOM *et al.*, 2002; SICHER, 2001), ou nenhum efeito (COURSINS; BLOOM, 2003) sobre a atividade da RN foliar.

Um dos mecanismos propostos para a limitação da redução do nitrato (NO₃⁻) por condições de elevado CO₂ pode ser a competição por poder redutor ou uma limitação na absorção (BLOOM, 2014). Apesar de existirem alguns estudos fisiológicos envolvendo a assimilação do nitrogênio sob condições de elevado CO₂, os mecanismos que regulam estas interrelações entre a assimilação do nitrogênio e do CO₂ ainda não foram examinados em soja. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar as modulações na assimilação do CO₂ e do nitrogênio por elevado CO₂ atmosférico em condições de câmara fechada.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

Elevado CO₂ atmosférico modula a fotossíntese e a assimilação do nitrogênio em plantas de soja.

2.2 Objetivo geral

Identificar como uma elevada concentração de CO₂ regula a assimilação fotossintética do CO₂ e a assimilação do nitrogênio em plantas de soja.

2.3 Objetivos específicos

1. Mensurar os seguintes parâmetros de trocas gasosas em folhas de plantas de soja (P_n , g_s , E e Ci);
2. Avaliar parâmetros provindos de modelagem da fotossíntese, por meio de respostas das curvas A-Ci;
3. Mensurar a atividade da Rubisco *in vitro*;
4. Mensurar a atividade da redutase do nitrato (RN);
5. Determinar o influxo de NO₃⁻, conteúdo de nitrato, N total, carboidratos solúveis, amido e sacarose;
6. Determinar parâmetros de estresse fisiológico através do conteúdo relativo de água, dano de membrana e pigmentos fotossintéticos (clorofila e carotenóides);
7. Realizar medições de massa fresca da parte aérea e raiz.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da soja

3.1.1 A produção mundial de soja

A economia cada vez mais globalizada tem sido o principal propulsor responsável pelo aumento da produção de soja. Com o crescente consumo em alguns países, como a China, por exemplo, tem ocorrido um aumento também na demanda por esta oleaginosa. Entre as safras de 1987/1988 e 2009/2010, enquanto a área cultivada cresceu 88,6%, a produção mundial foi ampliada em 150,7%. Nesse período, a área passou de 54 milhões de hectares para aproximadamente 102 milhões de hectares na safra 2009/10 atingindo a marca de 259,89 milhões de toneladas (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2010). Relatórios do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) para a safra 2013/2014 apontaram uma produção mundial de 283,54 milhões de toneladas, configurando uma elevação de 7% (16,39 milhões de toneladas). Dessa forma, o Brasil deverá se tornar o primeiro produtor mundial de grãos, com uma produção de 89.7 milhões de toneladas (USDA, 2014).

O grande incremento na produção mundial de soja pode ser atribuído a diversos fatores, dentre os quais merecem destaque: o elevado teor de óleo (ao redor de 20%) e proteína (em torno de 40%) de excelente qualidade encontrada nos grãos; a soja é uma commodity padronizada e uniforme, podendo ser produzida e negociada por produtores de diversos países, apresentando alta liquidez e demanda; e, sobretudo nas últimas décadas, houve expressivo aumento da oferta de tecnologias de produção, que permitiram ampliar significativamente a área cultivada e a produtividade da oleaginosa (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

O consumo mundial para 2012/2013 foi de 268,9 milhões de toneladas e a exportação em 107,3 milhões de toneladas (USDA, 2014). Dentre os fatores que contribuem para o aumento no consumo mundial de soja estão principalmente o crescente poder aquisitivo da população nos países em desenvolvimento, o que vem provocando uma mudança no hábito alimentar. Assim, observa-se cada vez mais a troca de cereais por carne bovina, suína e de frango. Tudo isso resulta em uma maior demanda de soja, ingrediente que

compõe 70% da ração para esses animais (VENCATO *et al.*, 2010). Não menos significativo é o crescente uso de biocombustíveis fabricados a partir do grão, resultado de um ascendente interesse mundial na produção e no consumo de energia renovável e limpa (FREITAS, 2011).

3.1.2 A cultura da soja no Brasil e a sua produção

No Brasil, o primeiro relato sobre o surgimento da soja através de seu cultivo é de 1882, no estado da Bahia (BLACK, 2000). Em seguida, foi levada por imigrantes japoneses para São Paulo, e somente, em 1914, a soja foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul, sendo este por fim, o lugar onde as variedades trazidas dos Estados Unidos melhor se adaptaram às condições edafoclimáticas, principalmente em relação ao fotoperíodo (BONETTI, 1981).

A implantação de programas de melhoramento de soja no Brasil possibilitou o avanço da cultura para as regiões de baixas latitudes, através do desenvolvimento de cultivares mais adaptadas por meio da incorporação de genes que atrasam o florescimento mesmo em condições de fotoperíodo indutor, conferindo a característica de período juvenil longo (KIIHL; GARCIA, 1989). Vale ressaltar que o Brasil apresenta um grande potencial para multiplicar a sua atual produção, tanto pelo aumento da produtividade, quanto pela expansão da área cultivada (MAPA, 2014).

Ao longo das últimas décadas, a produção brasileira de soja apresentou um grande avanço, impulsionada não somente pelo aumento de área semeada, mas também pela aplicação de técnicas de manejo avançadas que permitiram o incremento na produtividade. Avanços científicos em tecnologias para manejo de solos, com técnicas de correção da acidez, o processo de inoculação das sementes para fixação biológica do nitrogênio e a adubação balanceada com macronutrientes e micronutrientes, permitiram à cultura expressar a sua potencialidade nas diversas condições edafoclimáticas do território brasileiro (FREITAS, 2011).

3.2 Fisiologia e desenvolvimento da soja

A soja é classificada como uma espécie do ciclo C₃, isto é, pertence ao grupo das espécies de plantas cultivadas que fixam CO₂ pelo ciclo de Calvin, uma vez que os primeiros produtos estáveis da sua fotossíntese são as trioses denominadas de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) e glicerato, constituídas por três átomos de carbono (WANG *et al.*, 2011). Tem-se observado grande quantidade de glicerato, que parece ser derivada de uma hidrólise enzimo-catalizada do PGA, confirmada pela rápida conversão, na ausência de luz, do PGA para glicerato (SEDIYAMA *et al.*, 1985). Além do 3-PGA, os outros produtos primários da fotossíntese são: alanina, serina, glicina e glicolato. Em seguida, como produtos secundários da fotossíntese da soja observam-se: glucose, frutose, sacarose, rafinose, manose, ácido aspártico e ácido málico. As folhas mais novas sintetizam mais aminoácidos essenciais do que as folhas mais velhas (MÜLLER, 1981).

No processo fotossintético da fixação do CO₂, ocorre a reação da carboxilação e posterior quebra da pentose denominada ribulose 1,5-difosfato (RuDP). Esta reação é catalisada pela enzima Rubisco, que apresenta maior afinidade pelo CO₂ e menor pelo O₂, que são utilizados como substrato pela enzima. Em presença de maior concentração de O₂, este substitui o CO₂ resultando na oxigenação da ribulose-difosfato, em vez de sua carboxilação. Conseqüentemente, não se forma o 3-PGA; em seu lugar, ocorre a síntese de fosfoglicolato que ao sofrer hidrólise enzimática origina o glicolato, substrato da fotorrespiração (SEDIYAMA *et al.*, 1985).

Como na maioria das espécies cultivadas, o produto fotossintético primário exportado da folha da soja é a sacarose. Estudos com carbono marcado revelaram que a sacarose participa de mais de 90% do fotoassimilado translocado marcado. Quando a soja foi submetida à deficiência de nitrogênio, a sacarose participou de, aproximadamente, 100% do material exportado (NELSON *et al.*, 1961). Observando-se atentamente a face abaxial de um folíolo de uma folha madura de soja, nota-se uma intensa ramificação do sistema vascular, caracterizando as nervuras e os respectivos espaços internervurais, onde ocorre a maior concentração de estômatos e de células clorofiladas. A nervação foliar da soja assemelha-se a uma bacia hidrográfica constituída pelo

rio principal (nervura central), seus afluentes (ramificações primárias da nervura central) e subafluentes (demais ramificações). Os produtos da fotossíntese não são circulados entre as partes da folha ou entre células, mas saem das células através das nervuras do tecido de condução. Cada nervura atua somente numa certa parte da folha, pela qual os fotoassimilados são coletados, de maneira semelhante ao sistema fluvial onde a água é coletada em uma bacia pelos rios e riachos (CÂMARA, 1998a).

3.2.1 Germinação e emergência

No caso da soja, é raro o problema de dormência, porém, o fenômeno da quiescência pode ocorrer, principalmente quando não existe no solo, adequado suprimento de água para garantir o processo de embebição da semente. O fim da quiescência marca o início do processo de germinação, cuja primeira etapa é a absorção de água ou embebição, onde as sementes atingem grau de umidade de 35% a 50% (MARCOS FILHO, 1986).

Progredindo a embebição, ocorre a retomada imediata do metabolismo, por meio da ativação de sistemas enzimáticos que catalisam a digestão das reservas e estimulam o aumento da atividade respiratória nas células da semente. Em seguida, as reservas são transformadas em substâncias mais simples, solúveis e difusíveis, translocando-se, por difusão, até os pontos de crescimento do eixo embrionário (radícula e plúmula), onde são assimiladas para a formação de novos tecidos. Dessa forma, o embrião volta a crescer, originando uma plântula (MARCOS FILHO, 1986).

A emergência das plantas de soja (estádio VE), normalmente tem início 5 a 7 dias após a semeadura. Os cotilédones assumem coloração verde e são os principais responsáveis pela nutrição da plântula durante, aproximadamente, duas a três semanas após a emergência (CÂMARA, 1992).

3.2.2 Desenvolvimento vegetativo

Simultaneamente à formação das primeiras raízes e folhas unifolioladas e trifolioladas, ocorre o esgotamento gradativo das reservas contidas nos cotilédones, que em consequência, amarelecem e caem. Nesta fase, a planta apresenta uma a duas folhas definitivas (estádios V_2 a V_3) e encontra-se apta para seguir seu desenvolvimento autotrófico. As folhas unifolioladas são básicas para os processos iniciais de fotossíntese da jovem planta, podendo durar 4 a 6 semanas a partir da sua formação, conforme o cultivar e época de semeadura. Normalmente, antes ou durante o florescimento, amarelecem e caem (CÂMARA, 1992).

Segundo Câmara, (1998a) a fotossíntese líquida inicia-se na planta de soja a partir do 2º ao 5º dia após a emergência, com a capacidade fotossintética surgindo primeiro nos cotilédones (estádio VC). O desenvolvimento inicial da soja, desde a semeadura até a iniciação da fotossíntese, ocorre igualmente bem no ar natural ou no ar livre de CO_2 . A taxa de fotossíntese varia de 3,4 $\text{mg CO}_2 \text{ dm}^{-2}$ de área foliar por hora até 65 $\text{mg CO}_2 \text{ dm}^{-2}$ por hora. A taxa fotossintética da primeira folha trifoliolada de 26 cultivares de soja, cultivadas em câmara de crescimento, variou de 12 a 24 $\text{mg CO}_2 \text{ dm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (CURTIS *et al.*, 1969).

Taxas semelhantes foram verificadas por diversos pesquisadores, em folhas mais velhas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação e nas folhas mais altas de plantas cultivadas em condições de campo. As folhas mais baixas fotossintetizam em taxas menores do que as folhas superiores, indicando que a folha atinge o máximo à medida que apresenta a máxima expansão, daí, decresce à medida que são formadas novas folhas na parte superior. Esta redução na taxa fotossintética é aparentemente uma resposta da planta à reduzida intensidade luminosa (MÜLLER, 1981; SHIBLES *et al.*, 1987).

Os cultivares atualmente em uso no Brasil, principalmente aqueles com ciclo de maturação mais longo ou os com maior duração de período juvenil, produzem muito mais superfície foliar do que é necessário para a taxa de fotossíntese máxima. O auge do índice de área foliar da soja (IAF entre 5 e 8) ocorre nas fases de plena frutificação e início da granação. A maioria da luz incidente é capturada pela periferia externa do dossel vegetativo, de maneira

que as folhas mais baixas, embora não parasíticas, contribuem com pouca produção de fotoassimilados (CÂMARA, 1992).

Também deve ser considerado que, à medida que a luz penetra no dossel vegetativo, ocorrem modificações na composição espectral da luz, com a irradiação infravermelha e verde penetrando mais do que o azul ou o vermelho. Também, à medida que a soja se desenvolve através da estação de crescimento, o albedo (radiação refletida/radiação incidente total) aumenta até os estádios de florescimento e frutificação, decrescendo posteriormente. Em tais situações, as taxas de fotossíntese verificadas no dossel vegetativo foram de 10 a 60 mg CO₂ dm⁻² de área de solo, por hora, com uma temperatura ótima a 30°C (MÜLLER, 1981; SEDIYAMA *et al.*, 1985; SHIBLES *et al.*, 1987).

3.2.3 Desenvolvimento reprodutivo

A partir do momento em que a planta de soja inicia sua atividade fotossintética líquida, começa a adquirir e a acumular matéria seca em seus distintos órgãos, principalmente na haste principal, ramificações, pecíolos e folhas. A taxa de acúmulo de matéria seca acentua-se a partir da expansão do 4º ou 5º trifólio, intensifica-se durante o período de crescimento vegetativo, mantendo-se elevada até o início da granação, quando se acentua a translocação da massa seca dos órgãos vegetativos para os reprodutivos (CÂMARA, 1992). Segundo o mesmo autor desempenho semelhante é observado em relação à absorção e acúmulo de nutrientes, evapotranspiração da cultura, intensidade de nodulação radicular e assimilação de N.

Com o desenvolvimento dos sucessivos estádios fenológicos da soja, ocorre o aumento da área foliar da planta, aumentando a capacidade de interceptação da luz incidente sobre o dossel da cultura. Como existe correlação direta e positiva entre interceptação e absorção da luz e acúmulo de matéria seca da planta, tem-se que, a produção de matéria seca aumenta à medida que a área foliar aumenta (CÂMARA, 1992). Entretanto existe um limite, determinado pelo índice de área foliar denominado crítico, definido como o índice de área foliar que absorve 95% da radiação solar incidente (BUTTERY, 1970; SHIBLES; WEBER, 1965; SHIBLES *et al.*, 1975).

Por isso, deve-se dar atenção e preferência aos cultivares mais eficientes na conversão dos fotoassimilados para a produção de grãos, ao invés do crescimento vegetativo (SEDIYAMA *et al.*, 1985). Análises correlacionando a taxa de assimilação líquida e a taxa de crescimento da cultura indicaram que ocorrem dois picos de atividade fotossintética durante o desenvolvimento fenológico da soja, sendo um na época do florescimento (estádio R₂) e outro durante o enchimento da vagem (estádio R₅). Embora o fenômeno observado não tenha o seu motivo totalmente conhecido, infere-se que o aumento do tamanho do dreno fisiológico, determinado pelo acúmulo de matéria seca na forma de sementes no interior das vagens, tenha estimulado a fotossíntese (CÂMARA, 1998a).

Segundo o mesmo autor as sementes são formadas através do processo de fertilização da oosfera, seguido por divisões e diferenciações, podendo inicialmente ser vistas depois do desenvolvimento da vagem, caracterizando o início da granação da soja (estádio R₅). O acúmulo de matéria seca nas sementes evolui para o máximo volume das mesmas, quando se observam as cavidades das vagens totalmente preenchidas por sementes de coloração verde (estádio R₆).

As taxas de crescimento das vagens e de acúmulo de matéria seca pelas sementes são relativamente lentas até cerca de 25 a 35 dias após o início do florescimento. A partir desse momento tornam-se rápidas, ao mesmo tempo em que as vagens e sementes vão perdendo a coloração verde e assumindo a coloração característica do cultivar (pubescência cinza ou marrom). À medida que há transferência de matéria seca para as sementes, ocorre senescência (amarelecimento) e abscisão (queda) gradativa das folhas (estádio R₇) (CÂMARA, 1998a).

A maturação das sementes consiste de uma série de alterações físicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas verificadas a partir da fecundação do óvulo, encerrando-se quando a semente, ao atingir o máximo peso de matéria seca, se desliga fisiologicamente da planta e alcança a maturidade. Nesse momento, as sementes assumem coloração amarela e apresentam teor de umidade de, aproximadamente, 28% a 30% (MARCOS FILHO, 1980; MARCOS FILHO, 1986).

3.2.4 Desenvolvimento radicular

No caso da soja, o crescimento das raízes progride simultaneamente com o crescimento da parte aérea, variando em duração de acordo com o grupo de maturação e o hábito de crescimento do cultivar. Raízes de cultivares com hábito de crescimento determinado crescem até, aproximadamente, o início da frutificação (estádio R₃), enquanto nos de hábito de crescimento indeterminado, as raízes crescem até os estádios intermediários da granação (entre os estádios R₅ e R₆). A atividade radicular, compreendida como a capacidade de absorver água e nutrientes, ocorre até a máxima granação (estádio R₆), diminui à medida que a planta evolui para a maturidade fisiológica e cessa completamente na maturação final ou de campo (estádio R₈) (CÂMARA, 1998a).

Há que se considerar que a atividade radicular quanto à absorção de nutrientes é intensa até o início-meio do período de enchimento das vagens, enquanto que a absorção de água pelas raízes ocorre enquanto houver demanda evapotranspiratória pelo dossel da cultura. Quanto à nodulação, esta apresenta desenvolvimento e atividade intensa até o auge da fase reprodutiva, entre o florescimento e a plena granação (estádios R₂ a R₆), período em que é elevada a demanda de nitrogênio pela cultura, para a síntese e acúmulo de proteína nas sementes (CÂMARA, 1998a).

Mitchell e Russel citados por MÜLLER (1981), distinguem três fases no desenvolvimento do sistema radicular da soja, após a germinação das sementes:

a) durante a primeira fase, a raiz axial (principal) se desenvolve atingindo 45 a 60 cm de profundidade, sendo que no final existem numerosas raízes secundárias horizontais, formadas nos primeiros 10 a 15 cm da raiz axial.

b) na segunda fase, continua o desenvolvimento da raiz axial, atingindo até 75 cm de profundidade. Além disso, destacam-se das demais, 4 a 6 raízes secundárias que se estendem horizontalmente ou com pouca inclinação, podendo chegar a até 75 cm de distância da raiz axial. Após essa distância, aprofundam-se verticalmente no solo, desenvolvendo-se vigorosamente.

A primeira e segunda fase caracterizam o crescimento vegetativo da planta até momentos após o início do florescimento, resultando na formação de hastes, ramificações e folhas que darão suporte à nutrição das futuras flores, vagens e sementes.

c) a terceira e última fase corresponde ao período de formação das vagens, enchimento dos grãos e maturação fisiológica, quando a raiz axial diminui seu crescimento e as secundárias se aprofundam, atingindo até 180 cm de profundidade. A maior parte das raízes absorventes e do volume do sistema radicular encontra-se nos primeiros 15 cm do solo.

3.3 Fotossíntese e fotorrespiração no ciclo C₃

Em plantas superiores C₃, a fotossíntese é conceitualmente separada em duas fases: Fotoquímica, com reações dependentes da luz onde existem os complexos coletores de luz, fotossistemas e uma cadeia transportadora de elétrons responsável por produzir ATP e energia redutora na forma de NADPH, e Bioquímica, um conjunto de reações bioquímicas que formam o Ciclo de Calvin utilizando o ATP e NADPH gerado para produzir carboidratos a partir do CO₂ absorvido (TAIZ; ZAIGER, 2008).

Durante a evolução, as duas fases da fotossíntese têm promovido melhorias nos seus processos, como mudanças que aumentam a eficiência nos complexos que coletam a luz, promovendo maior eficácia na produção na produção de ATP e NADPH (VASIL`EV; BRUCE, 2004), e mecanismos que promovam a maior eficiência da carboxilase:oxigenase da Ribulose-1,5- bifosfato (Rubisco), que é a responsável pela carboxilação (SAGE, 2004).

A Rubisco é uma enzima que, em seu sítio de ativação, pode receber tanto gás carbônico (CO₂) como oxigênio (O₂). Essa característica não foi problema, pois, quando do surgimento desta enzima e do processo fotossintético, a atmosfera tinha uma relação CO₂/O₂ elevada o suficiente para que o processo de oxigenação fosse desprezível (TAIZ; ZAIGER, 2008).

À medida que a evolução fez com que as plantas dominassem o ambiente terrestre, a relação CO₂/O₂ foi sendo reduzida até o ponto em que a atividade oxigenase da Rubisco não era mais desprezível. Nesse momento, o

processo fotorrespiratório tornou-se uma porção considerável da atividade total da Rubisco (SAGE, 1999).

Esse processo, chamado fotorrespiração acontece quando a Rubisco assimila oxigênio, gerando dois compostos diferentes, o 3-fosfoglicerato e o 2-fosfoglicolato. O primeiro é normalmente utilizado no ciclo de Calvin, mas o segundo, por conter apenas dois átomos de carbono, segue um caminho diferente para ser regenerado, passando por peroxissomos e mitocôndrias, além dos cloroplastos e com maior gasto energético denominando um processo chamado de fotorrespiração.

A fotorrespiração pode ser descrita como um processo metabólico que ocorre acoplado à fotossíntese, na presença de luz, envolvendo a interação das organelas: mitocôndria, cloroplasto e peroxissomos (LARCHER, 2004). Esta reação é competitivamente diminuída pelo aumento de CO_2 , visto que a Rubisco, primeira enzima que inicia o processo fotorrespiratório, possui afinidade tanto pelo O_2 como pelo CO_2 , havendo uma alta afinidade pelo CO_2 ($K_M = 9 \mu\text{M}$) e ao mesmo tempo, uma baixa, porém, considerável afinidade pelo O_2 ($K_M = 535 \mu\text{M}$) (WOODROW; BERRY, 1988).

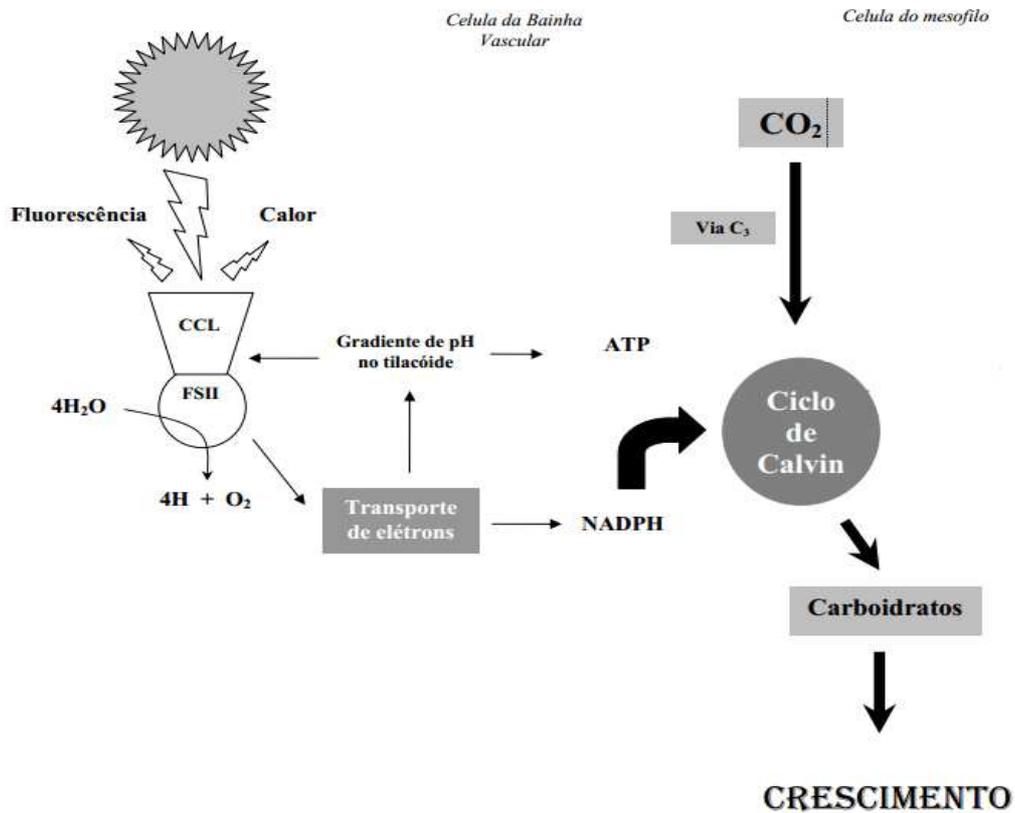
Nos cloroplastos, o primeiro produto da fotorrespiração é o fosfoglicolato catalisado pela Rubisco, o qual é convertido em glicolato com a liberação de fosfato pela fosfatase do fosfoglicolato. O glicolato é então transportado para os peroxissomos por um translocador presente no envelope interno da membrana do cloroplasto (HELDT, 1997).

Nos peroxissomos, glicolato é oxidado a glioxilato pela oxidase do glicolato (GO) em uma reação irreversível. Nesta reação, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado e rapidamente convertido em água e oxigênio pela catalase (CAT), presente nessas organelas. O glioxilato é transaminado a glicina pela glutamato: glioxilato aminotransferase (GGAT), ainda nos peroxissomos. A glicina formada é transportada para mitocôndria, onde metade das moléculas de glicina é convertida a N5-N10-metileno tetrahydrofolato (THF) na reação catalisada pela glicina descarboxilase (GDC) e nesta reação, NH_3 e CO_2 são liberados (HELDT, 1997).

A outra metade das moléculas de glicina pode reagir com o N5-N10-metileno (THF) para formar serina pela reação com a serina hidroximetiltransferase (SHMT). A serina formada é transportada para os peroxissomos, onde há reação de transaminação da serina e glioxilato através da serina:glioxilato aminotransferase (SGAT) resulta na produção de glicina e hidroxipiruvato (WINGLER *et al.*, 2000; FOYER *et al.*, 2009). O hidroxipiruvato é reduzido a glicerato pela enzima redutase do hidroxipiruvato (HR) as expensas de um NADH. O glicerato é então liberado dos peroxissomos e exportado para os cloroplastos. Nos cloroplastos, glicerato é fosforilado pela quinase do glicerato (do inglês, GK) para formar 3-fosfoglicerato que pode entrar no ciclo de Calvin para ser usado na biossíntese de carboidratos e na regeneração da RuBP (HELDT, 1997).

Observa-se na figura 1 um esquema mostrando a via C₃ do processo de fotossíntese e suas interrelações. Plantas como soja e feijão utilizam esta via C₃ para a fotossíntese.

Figura 1 - Esquema de Ellsworth mostrando a via C_3 do processo de fotossíntese e suas interrelações.



Fonte: Ellsworth (2004).

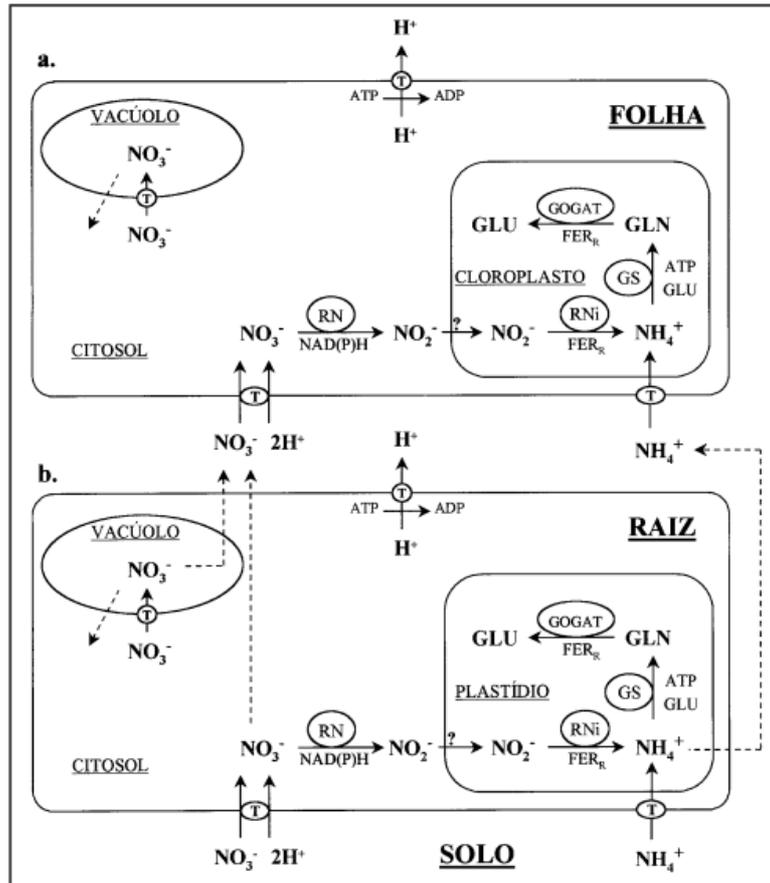
CCL = complexo coletor de luz, FSII = fotossistema II, ATP = adenosina trifosfato, NADPH = nicotinamida adenosina difosfato reduzida.

3.4 A absorção e a assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas

A passagem de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) através da membrana plasmática (plasmalema) das células da epiderme e do córtex da raiz ocorre através de transportadores específicos para essas formas de nitrogênio (LARSSON; INGEMARSSON, 1989). A figura 2 mostra que, após a sua entrada na célula, o nitrato pode ser reduzido a nitrito (NO_2^-), no citosol, através da enzima redutase do nitrato (RN) e, logo a seguir, convertido a amônio (NH_4^+) no plastídio, através da enzima redutase do nitrito (RNi). O amônio é incorporado em aminoácidos pelas enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos e seus metabólitos (CRAWFORD, 1995).

Alternativamente, o NO_3^- e o NH_4^+ podem ser transportados por carregadores específicos através do tonoplasto e armazenados no vacúolo, para posteriormente serem reduzidos no citosol da mesma célula ou serem translocados inalterados para a parte aérea da planta (figura 2). Nos colmos e folhas (figura 2a), o nitrato é reduzido a nitrito pela ação da enzima RN, e o amônio, através da enzima RNi. O amônio é então incorporado em aminoácidos pelas enzimas GS e GOGAT. Estes elementos também são armazenados no vacúolo das células para posterior redução e utilização (KING *et al.*, 1993; CRAWFORD, 1995).

Figura 2. Representação esquemática da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas.



Fonte: Bredemier & Mundstock

(NO_3^- : nitrato; NO_2^- : nitrito; NH_4^+ : amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; RN: redutase do nitrato; RNi: redutase do nitrito; GS: sintetase da glutamina; GOGAT: sintetase do glutamato; T: transportador).

3.5 Regulação da assimilação do nitrogênio

A assimilação do N compreende os processos de redução do nitrato a amônio e a incorporação do amônio em aminoácidos. A taxa e a quantidade de nitrogênio assimilado pelas plantas durante o seu ciclo dependem da atividade das enzimas envolvidas no ciclo do nitrogênio e da disponibilidade de energia necessária para os processos de assimilação (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000) .

3.5.1 Regulação pelas enzimas do ciclo do nitrogênio

A RN foi considerada enzima chave na regulação do metabolismo de N na década de 70 (BEEVERS; HAGEMAN, 1969), em razão de que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a amônio antes de ser incorporado em compostos orgânicos, seja no sistema radicular, seja na parte aérea (Figura 2).

Ela é a primeira enzima na cadeia de redução do nitrogênio dentro do processo de assimilação do N nas plantas (PURCINO *et al.*, 1994). Por causa desse seu papel regulador, a atividade da RN poderia estar relacionada, indiretamente, com a produtividade das culturas. Isso com base na suposição de que plantas com alta atividade da RN teriam maior capacidade de assimilar o nitrato disponível e, em conseqüência, maior capacidade em responder à adubação nitrogenada (BEEVERS; HAGEMAN, 1969).

Vários trabalhos experimentais foram conduzidos para testar essa hipótese e para avaliar a possibilidade de se utilizar a atividade dessa enzima como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de genótipos mais produtivos ou mais eficientes no uso do nitrogênio (HAGEMAN *et al.*, 1967; HAGEMAN; LAMBERT, 1988; PURCINO *et al.*, 1994; MACHADO; MAGALHÃES, 1995). Esses trabalhos tiveram início no final da década de 60, na Universidade de Illinois (EUA), através das pesquisas desenvolvidas por R.H. Hageman, que avaliou a possibilidade de selecionar híbridos de milho mais produtivos em função da maior atividade da RN (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000) .

Essa linha de pesquisa foi desenvolvida com base no trabalho de Beevers, (1969), que verificaram o aumento da atividade da RN com a adição de NO_3^- ao meio de cultivo em inúmeras espécies de plantas. Essa idéia foi reforçada pelas correlações positivas entre produtividade de grãos de híbridos de milho e atividade da RN obtidas por (DECKHARD *et al.*, 1973). As correlações, apesar de significativas, foram baixas, indicando que outros fatores, além da atividade da RN, têm forte influência na assimilação de NO_3^- e na produtividade do milho.

Posteriormente, trabalhos como os de Fakorede e Mock (1978) e Eichelberg *et al.* (1989) não mostraram aumentos de produtividade de híbridos de milho associados com aumentos na atividade da RN e concluíram que a atividade da RN não era um critério adequado para ser utilizado como parâmetro no melhoramento, e tampouco como indicativo de alta eficiência na assimilação do N. Progressivamente, foi sendo descartada a hipótese que uma alta atividade da RN pudesse ser usada como critério de seleção para a identificação de genótipos mais produtivos. Isso veio ao encontro da proposta de Hageman e Lambert (1988), de que ganhos no rendimento de grãos são pouco prováveis de ocorrer se for usada somente uma particularidade enzimática relacionada ao metabolismo do nitrogênio.

3.5.2 Características da enzima redutase do nitrato - RN

A redutase do nitrato (RN) inicia o primeiro passo enzimático da assimilação do nitrogênio pelas plantas superiores por meio da redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) (YANEVA *et al.*, 2000), conforme esquematizado na reação 3:



A RN é uma flavoproteína formada por duas subunidades idênticas, com três grupos – FAD, heme e um complexo constituído entre o molibdênio (Mo) e uma molécula orgânica (CAMPBELL, 1999), razão porque é, também, denominada uma molibdopterina.

A maioria das formas de enzima RN das plantas utiliza o agente redutor NADH produzido no citossol e não o redutor NADPH formado no cloroplasto (SOLOMONSON; BARBER, 1990). Crawford *et al.* (2000) afirmam que algumas formas dessas enzimas, com dupla especificidade, podem utilizar tanto o redutor NADPH quanto NADH. A enzima RN está localizada, primariamente, no citosol das células corticais da epiderme da raiz e nas células mesofílicas da parte aérea (CAMPBELL, 1988).

3.5.3 Regulação da atividade da redutase do nitrato (RN)

Segundo Vincentz *et al.* (1993), a atividade da enzima RN nas folhas e raízes é induzida pela presença do substrato (NO_3^-). Havendo nitrato, ocorre um estímulo à síntese de novo da referida enzima (HEWITT *et al.*, 1976). O fluxo catalítico da RN ou a capacidade total de redução do nitrato pelas plantas depende: (i) da disponibilidade de substrato no citoplasma (concentração em estado de equilíbrio do NADPH e nitrato); (ii) do nível de RN funcional – quantidade de RN polipeptídica e da disponibilidade de cofatores e íons metálicos, FAD, heme, Fe, Mo-MPT (molibdênio-molibdopterina) e molibdênio; (iii) da intensidade da RN funcional (CAMPBELL, 1999). Cada processo é regulado direta ou indiretamente e a capacidade de redução do nitrato é controlada em relação ao nível metabólico total da planta por sensores e rotas

de sinais. A quantidade de glutamina livre e a sua proporção em relação ao glutamato disponível, assim como os teores de nitrato são, provavelmente, os metabólitos chave que governam a capacidade de redução do nitrato (HEWITT *et al.*, 1976).

O teor de equilíbrio da RN é determinado pela taxa de sua degradação, assim como, pela taxa de síntese da mesma. A meia vida de uma proteína RN é de poucas horas na célula e quando a quantidade de nitrato diminui, o teor da RN é rapidamente reduzido (TAIZ; ZEIGER, 2004). A resposta das plantas à quantidade de nitrato depende de outros fatores, entre os quais o material genético e o ambiente (CAMPBELL, 1999). Em plantas sob condições ótimas de crescimento, a capacidade de redução do nitrato é aproximadamente o dobro das necessidades das plantas. A atividade da RN varia durante o dia, apresentando baixa atividade no escuro (SHEIBLE *et al.*, 1997). Para Kaiser e Huber (2001) em condições normais de ativação e na presença de luz, a sua ação seria da ordem de 70% a 90%, reduzindo para 10% e 30% no escuro. Estes autores afirmam que a luz não é um sinal direto para a atividade dessa enzima (RN), pois mesmo sob intensa e contínua luminosidade a RN é inativada quando falta CO₂ indicando que a fotossíntese é requerida para a sua ativação (RN). Esta constatação indica que a redução do nitrato é sensível a resistência estomática, de maneira que em plantas com estômatos fechados, como acontece em elevadas concentrações de CO₂, são prejudiciais a taxa fotossintética e a atividade da RN (KAISER; HUBER, 2001).

Provavelmente, os fotoassimilados exportados para fora do cloroplasto funcionam como sinalizadores capazes de ativar a RN. Roth *et al.* (1996) examinando um mutante de milho deficiente em ribulose bifosfato carboxilase e que perdeu a capacidade de processar o ciclo de Calvin, obtiveram menor atividade da RN na presença de luz e também no escuro, dando suporte à hipótese de que a ativação da RN na presença de luz depende dos produtos desse ciclo. Entretanto, não estão devidamente esclarecidos quais são os componentes que estão envolvidos quando um sinal é transferido dos cloroplastos, onde a fotossíntese está ocorrendo, para dentro do citosol, local de ação da RN. Intermediários ou derivados do ciclo de Calvin como, por exemplo, açúcares ou açúcar fosfato, são elos importantes (PROVAN; LILLO, 1999). De acordo com Bachmann *et al.* (1995) a RN pode ser ativada no escuro por meio

do fornecimento de açúcares às folhas. Além disso, a inativação da RN no escuro foi atenuada em um mutante que não produz amido e acumula altos níveis de açúcares fosfatos.

3.5.4 Sintetase da glutamina (GS) / Sintase do glutamato (GOGAT)

O papel da GS e GOGAT no processo de transaminação (Figura 2) foi estabelecido na década de 80, através dos trabalhos de Woo e Osmond (1982) e (FENTEM *et al.*, 1983). Eles vieram substituir o conceito de que a enzima dehidrogenase do glutamato (GDH) era responsável pela maior parte da incorporação do NH_4^+ no ácido α -ceto glutárico, formando o glutamato. Em razão da inconsistência dos resultados dos trabalhos com a RN, na procura de associação entre atividade enzimática e capacidade de assimilação de N pelas plantas, foi levantada a hipótese de que a atividade das enzimas GS e GOGAT estariam mais relacionadas a essa capacidade.

O pressuposto foi que os genótipos eficientes no uso do nitrogênio são aqueles que têm alta capacidade de incorporar o íon amônio em aminoácidos, através das enzimas GS e GOGAT. Assim, o trabalho de MACHADO *et al.* (1992) mostrou uma alta correlação ($r=0.68$) entre a atividade da enzima GS e a produção de grãos de genótipos de milho. Esse e outros trabalhos (MACHADO; MAGALHÃES, 1995; MAGALHÃES; MACHADO, 1995) indicaram que a determinação da atividade da enzima GS poderia ser utilizada como um parâmetro auxiliar na seleção de genótipos mais eficientes na utilização do nitrogênio. É importante destacar que existe variabilidade genética para essa característica (MACHADO *et al.*, 1992; MAGALHÃES *et al.*, 1993). O uso generalizado desse parâmetro, no entanto, fica limitado pelo fato de que a assimilação do amônio em aminoácidos só é limitante quando somente essa forma de N é suprida às raízes e/ou quando a quantidade absorvida excede a capacidade assimilatória da planta (HARPER, 1994).

3.5.5 Regulação pela disponibilidade energética

A exigência energética da assimilação do nitrogênio varia em função da fonte de nitrogênio (nitrato ou amônio) disponível às plantas e dos órgãos da planta onde ele é metabolizado. Fonte de nitrogênio suprida às raízes (NO_3^- ou NH_4^+). A assimilação de nitrogênio (figura 2) é um processo altamente exigente em termos de energia, requerendo a transferência de 2 elétrons por NO_3^- convertido em NO_2^- , 6 elétrons por NO_2^- convertido em NH_4^+ e 2 elétrons e 1 ATP por molécula de NH_4^+ convertida em glutamato (BLOOM *et al.*, 1992).

Disso decorre que a assimilação do NO_3^- demanda mais energia, em comparação à assimilação do NH_4^+ . Isso é indicado por maiores taxas de liberação de CO_2 respiratório no processo de assimilação do nitrato (WEGER; TURPIN, 1989). Essa diferença foi confirmada por BLOOM *et al.* (1992) em cevada, mostrando que o metabolismo do NO_3^- consumiu 23% de toda energia produzida na raiz, em comparação aos 14% exigidos para o metabolismo do NH_4^+ . A exigência energética da assimilação do amônio é menor do que a exigência energética para a assimilação do nitrato, em razão do primeiro não precisar ser reduzido para sua incorporação em aminoácidos (figura 2). O aproveitamento dessa vantagem energética orientou a criação do programa de seleção de linhagens de milho com maior eficiência na utilização do NH_4^+ no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) da EMBRAPA.

A pressuposição foi que as plantas supridas com amônio exigem menos energia para crescer e, em decorrência, o número de plantas por área pode ser aumentado, resultando em maior produtividade líquida (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Para tanto, as plantas necessitam ter alta atividade da GS e GOGAT e o NH_4^+ deve ser a forma do fertilizante aplicado ao solo e preferencialmente assimilada pela planta. O fertilizante amoniacal tem vantagens pelo fato do íon amônio ser fortemente adsorvido às partículas de solo (MAGALHÃES *et al.*, 1993), evitando perdas por lixiviação, e pela redução da exigência energética na assimilação de N. Além disso, o íon amônio parece ser a forma predominante de absorção de N pelas plantas em condições de stress (MAGALHÃES; FERNANDES, 1990).

A seleção de genótipos de milho baseia-se na menor acumulação de NH_4^+ livre no tecido (ele é tóxico em altos níveis) e maior atividade da enzima sintetase da glutamina (GS) no tecido verde da planta. Em complemento, os genótipos selecionados são testados em solos com inibidores da nitrificação (MAGALHÃES *et al.*, 1993; MAGALHÃES; MACHADO, 1995). Isso é importante, pois o íon de nitrogênio absorvido pelas plantas (NO_3^- ou NH_4^+) depende das quantidades relativas de cada uma das formas no solo, da acessibilidade das raízes a essas diferentes formas e das preferências da planta (VONWIRÉN *et al.*, 1997). Um complicador neste processo é que, na maioria dos casos, a manutenção do balanço entre cátions e ânions na célula pode determinar a forma de N preferencialmente absorvida pelas plantas (VAN BEUSICHEM *et al.*, 1988).

3.6 Local de assimilação (raiz ou parte aérea)

O nitrogênio, uma vez absorvido, pode ser assimilado na própria raiz ou ser transportado para as folhas, onde, então, ocorre a sua assimilação. Nas folhas, a energia para as reações de assimilação do nitrogênio (figura 2) é gerada nos cloroplastos pela fotossíntese, no citosol pela glicólise, e nos mitocôndrios pelo ciclo do ácido tricarboxílico no processo de respiração (OAKS; HIREL, 1985; HUPPE; TURPIN, 1994). Nos cloroplastos, as reações catalisadas pelas enzimas redutase do nitrito (RNi) e sintase do glutamato (GOGAT) exigem a redução da ferredoxina, o que é feito pelo sistema de transporte não-cíclico de elétrons (CRAWFORD, 1995).

Quando o nitrogênio é metabolizado nas raízes, a energia é gerada no citosol, através do ciclo das pentoses e da glicólise, e nos mitocôndrios pelo ciclo do ácido tricarboxílico (OAKS; HIREL, 1985). A ferredoxina, para as reações que envolvem a RNi e a GOGAT, é reduzida no citosol pelo NADPH produzido pelo ciclo das pentoses (CRAWFORD, 1995). Nas raízes, existe a necessidade de importação de carboidratos produzidos nas folhas para, após serem metabolizados, gerar energia e fornecer esqueletos de carbono para o processo de incorporação do nitrogênio em aminoácidos (OAKS; HIREL, 1985; TURPIN *et al.*, 1991; OAKS, 1994).

Um estudo comparativo dos custos energéticos para a conversão de NO_3^- em glutamato em tecidos verdes (folhas) e em tecidos não-verdes (raízes) (HARPER, 1994). A assimilação de uma molécula de NO_3^- em aminoácidos em tecidos não-verdes consumiu a energia equivalente à absorção de 35 fótons, enquanto que nas folhas esse mesmo processo consumiu a energia equivalente à absorção de 20 fótons. Essa vantagem energética é a base da sugestão da seleção de linhagens que maximizem a redução de NO_3^- nas folhas, visando a reduzir as exigências energéticas e aumentar a produtividade (SCHRADER, 1984).

3.7 Interações entre o metabolismo do carbono e o do nitrogênio

O metabolismo de carboidratos fornece energia (ATP), agentes redutores (NAD(P)H), ferredoxina (Fd) e esqueletos de carbono para a redução do NO_3^- e a assimilação do amônio, para a formação de aminoácidos, proteínas e enzimas. Estes produtos atuarão nos processos fotossintéticos, respiratórios e na síntese de enzimas associadas à assimilação do nitrogênio, como a redutase do nitrato, redutase do nitrito, o sistema glutamina sintase (GS) – glutamina oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) e aminotransferases (LAWLOR, 2002). Por essas razões, o metabolismo do carbono e o do nitrogênio estão intrinsecamente interligados. Os esqueletos de carbono usados na biossíntese de aminoácidos provêm, principalmente, da respiração (glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e rota das pentoses fosfatadas). Todavia, vários aminoácidos podem ser formados a partir de produtos do Ciclo de Calvin. Assim, compostos intermediários desses processos básicos podem ser reunidos para a formação de aminoácidos (MARENCO; LOPES, 2005).

A incorporação do N-inorgânico, por meio do processo assimilatório, formando aminoácidos (por exemplo, glutamato e aspartato) e amidas (glutamina e asparagina), é dinâmica, sendo regulado por fatores externos (luz, temperatura) e internos, relacionados ao metabolismo do carbono, bem como a processos vinculados à manutenção de um balanço de carbono adequado nos diferentes compartimentos da célula (MIFLIN, 2002). De acordo com Marengo e Lopes (2005), o glutamato e a glutamina são importantes no metabolismo

vegetal por fornecerem nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos, ácidos nucléicos e outros compostos nitrogenados.

Obviamente, o teor de nitrogênio da planta influencia o padrão de distribuição de carboidratos dentro desta, o que afeta o crescimento e a produtividade, havendo, portanto, uma forte correlação entre o teor de nitrogênio na planta e a produção de biomassa (LAWLOR, 2002). Segundo Camargos (2002) tanto o metabolismo do carbono como o do nitrogênio dependem um do outro e ambas as vias são reguladas uma pela outra. Segundo o mesmo autor a conexão entre ambas as vias tem sido investigada utilizando cultivos de dias curtos, plantas com expressão reduzida de RN e adição de açúcares. Plantas com baixa expressão de RN acumulam altas concentrações de nitrato e apresentam aumento no crescimento de parte aérea, indicando uma mudança na alocação de carbono em função do acúmulo de nitrato.

A produtividade de uma pastagem anual na Califórnia foi reduzida após terem sido expostas a altos níveis de CO_2 , quando estas tiveram como fonte predominante o NO_3^- (DUKES *et al.*, 2005), provavelmente porque a assimilação de NO_3^- em condições de alto CO_2 tornou-se limitante. Esta dependência relativa poderia ser explicada pelas variações nas concentrações atmosféricas de CO_2 , estimulando o fenômeno da aclimatação ao CO_2 (BLOOM *et al.*, 2010). No entanto, os resultados obtidos por estes autores indicam que altas concentrações atmosféricas de CO_2 e baixas de O_2 inibem a redução do NO_3^- e que esta inibição é controlada pela absorção radicular, uma vez que altos níveis de CO_2 e baixos de O_2 influenciam diretamente a absorção radicular.

Bloom *et al.* (2010) relataram a possibilidade de três mecanismos fisiológicos distintos que poderiam explicar esta inibição na redução do nitrato: O primeiro mecanismo fisiológico estaria envolvido na primeira etapa bioquímica da assimilação de N, que seria a conversão de NO_3^- para NO_2^- no citosol da célula foliar. A fotorrespiração estimula a exportação de ácido málico do cloroplasto (BACKHAUSEN *et al.*, 2000) e aumenta a disponibilidade da forma reduzida de nicotimida adenina dinucleotido (NADH) no citoplasma (IGAMBERDIEV *et al.*, 2001) que alimenta esta primeira etapa. Elevadas concentrações atmosféricas de CO_2 e baixas de O_2 diminuem a fotorrespiração e por meio deste diminui a quantidade de agente redutor disponível para a redução de NO_3^- . Em contraste, a via de fixação de carbono C4 gera grandes quantidades de ácido málico e

NADH no citoplasma do mesófilo foliar. Isto poderia explicar porque a assimilação do N na parte aérea é independente das concentrações de CO₂ em plantas C₄ (COUSINS, 2003).

O segundo mecanismo fisiológico que poderia ter ligação com a assimilação do N em condições de elevadas concentrações de CO₂ seria a translocação do NO₂⁻ do citosol para o cloroplasto. Seis transportadores da família *NarI* estão envolvidos na translocação de NO₂⁻ do citosol para o cloroplasto em *Clamidomonas*, sendo que alguns destes transportam tanto NO₂⁻ quanto HCO₃⁻ (MARISCAL *et al.*, 2006). Uma diminuição no influxo de NO₂⁻ para o cloroplasto sob elevadas concentrações de CO₂ reduziria a assimilação do N (BLOOM *et al.*, 2010).

O terceiro mecanismo fisiológico seria uma competição por poder redutor no estroma do cloroplasto. Vários processos dentro do estroma de plantas com o metabolismo C₃, como a redução de NO₂⁻ a NH₄⁺, e a incorporação de NH₄⁺ em aminoácidos requerem o poder redutor gerado no transporte de elétrons da fotossíntese, fornecido pela ferredoxina. Como resultado, a assimilação de N poderia prosseguir se a disponibilidade de ferredoxina reduzida excedesse a necessária para a formação da forma reduzida de (NADPH) (BACKHAUSEN *et al.*, 2000). Para muitas plantas, isto ocorre quando a disponibilidade de CO₂ é limitante para a fixação de carbono em plantas C₃ (BLOOM *et al.*, 2002).

3.8 Plantas C₃ submetidas a elevadas concentrações de CO₂: o que é conhecido atualmente

Elevadas concentrações de CO₂ podem aumentar a fotossíntese líquida em plantas C₃, porque a Rubisco é uma enzima envolvida tanto na fixação de CO₂ quanto na fotorrespiração, sendo saturada na concentração atmosférica atual (DRAKE *et al.*, 1997). Assim, um aumento na concentração ambiente de CO₂ aumenta a concentração interna de CO₂ e a proporção CO₂/O₂ no sítio da Rubisco, favorecendo a carboxilação sobre a oxigenação na ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) (MATA *et al.*, 2012).

Teoricamente, elevadas concentrações de CO₂ podem incrementar a assimilação de CO₂ em plantas C₃ por pelo menos duas razões: (i) a

fotorrespiração é reduzida e (ii) aumenta a disponibilidade de substrato da Rubisco (SAGE, 2002).

O aumento da concentração atmosférica de CO₂ geralmente tem dois efeitos fisiológicos diretos e momentâneos sobre as plantas: (i) estimula a fotossíntese das folhas, por causa das elevadas concentrações de CO₂ nos sítios de fixação e; (ii) ocasionam a queda na condutância estomática, reduzindo assim a perda de água por transpiração (POOTER; PEREZ-SOBA, 2002). Especificamente, três processos principais desencadeiam estes efeitos: a sensibilidade das células-guarda dos estômatos aos níveis de CO₂; a modulação da atividade da Rubisco; e a modulação da respiração mitocondrial (SAGE, 2002).

Estudos eletrofisiológicos mostraram que o alto CO₂ modifica a atividade de canais de K⁺ tanto para fora quanto internamente, estimula a liberação de Cl⁻ a partir de células guarda e aumenta a concentração de Ca²⁺ nas células guardas (AINSWORTH; ROGERS, 2007). Estas mudanças coletivamente despolarizam o potencial de membrana das células guarda e causarão fechamento dos estômatos (ASSMANN, 1993).

O fechamento estomático e conseqüentemente o decréscimo da transpiração em condições de elevadas concentrações de CO₂ podem diminuir a absorção de alguns nutrientes dependente do fluxo de massa através do solo para a superfície das raízes modificando a taxa de absorção (VAN VUUREN *et al.*, 1997; TAUB; WANG, 2008). Existe uma forte correlação positiva entre o conteúdo de nitrogênio na planta e a transpiração (SHIMONO; BUNCE, 2009).

A sub-regulação da capacidade fotossintética pode envolver decréscimos na atividade da Rubisco e no conteúdo total de nitrogênio (LONG *et al.*, 2004). A aclimatação é geralmente manifestada por taxas mais baixas de assimilação de CO₂ em plantas cultivadas sob altas concentrações de CO₂ quando comparadas com as que permaneceram em condições ambiente, havendo assim uma redução na fotossíntese limitada pela Rubisco. Pode-se também observar uma redução na ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) limitando a fotossíntese em condições de saturação de CO₂.

Conseqüentemente, três tipos de aclimatação foram encontrados (AINSWORTH, 2007): (i) a taxa de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) não é afetada pela alta concentração de CO₂, mas a taxa de transporte de elétrons decresce (J_{max}); (ii) o V_{cmax} decresce, enquanto que o J_{max} permanece inalterado

e (iii) ambos V_{cmax} e J_{max} são reduzidos. O grau de resposta destas variáveis depende de vários fatores; como das espécies de plantas (ETHIER, 2008), duração da exposição ao alto CO_2 (ZHOU, 2011), suprimento de nutriente (nitrogênio) (CROUS, 2008), e de um forte dreno para os carboidratos (AINSWORTH, 2007). A sub-regulação da fotossíntese limitada pela Rubisco em condições de elevado CO_2 é muitas vezes acompanhada por uma redução na atividade da Rubisco (FUKAYAMA *et al.*, 2009). Podendo ser causado por (i) um declínio no teor da proteína Rubisco, (ii) inibição da enzima carbomiladora, ou (iii) um aumento na proporção das formas inativas não carbomiladoras da Rubisco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

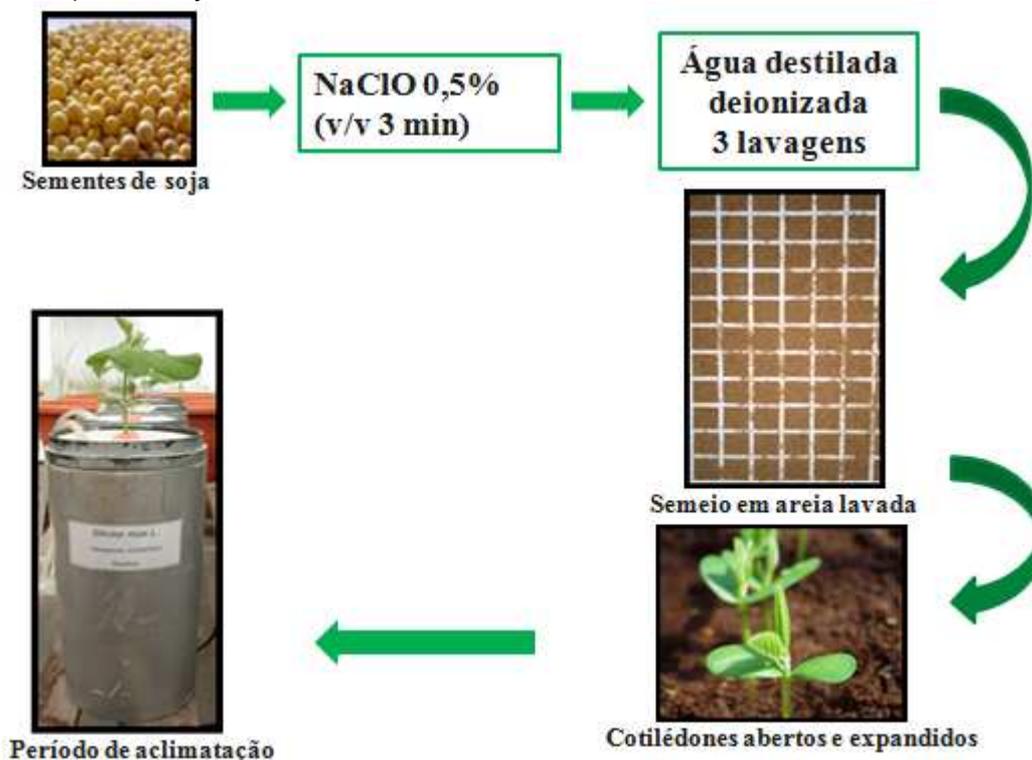
4.1 Material vegetal e condições de crescimento

Plantas de soja (*Glycine max* L.) com 25 dias de idade (cv. SAMBAIBA), fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), foram cultivadas em sistema hidropônico aerado.

As sementes de soja foram padronizadas quanto ao tamanho e forma. Inicialmente, foram esterilizadas superficialmente, por tratamento com hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) por 3 minutos e lavadas três vezes em água destilada, sob agitação eventual. A seguir, foram colocadas para germinar em bandejas de isopor contendo areia lavada e irrigadas com água destilada por quatro dias. As plântulas foram transplantadas no estágio vegetativo VC, onde os cotilédones estavam completamente abertos e expandidos, para vasos de 0,9 L contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada a $\frac{1}{4}$ de força pH 6,0. Após quatro dias, a solução foi modificada para $\frac{1}{2}$ de força e a única forma de N foi 10 mM de NO_3^- (figura 3).

As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação sob condições naturais de temperatura (28-35°C), UR (40-80%), densidade máxima de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 h.

Figura 3 – Fluxograma das condições de crescimento das plantas de soja utilizadas nas experimentações.



4.2 Tratamentos e coleta do material vegetal

4.2.1 Experimento: Modulação na fotossíntese e assimilação do nitrogênio por condições de elevado CO_2 atmosférico em plantas de soja

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar a causa da modulação promovida pelo elevado nível de CO_2 na fotossíntese e na assimilação do nitrogênio. Foram realizados estudos utilizando plantas jovens de soja (25 dias), obtidas por sementes e cultivadas em casa de vegetação. As plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento (Fitotron) sob condições controladas, apresentando os valores médios de temperatura $28^\circ C$, UR 70%, PPF de $500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h, onde permaneceram para aclimação e futura aplicação dos tratamentos de CO_2 . Após 24 h de aclimação, um lote de planta foi mantido sob condições ambiente (controle: 40 Pa) por um período de 6 dias e posteriormente um outro lote foi submetido a elevada pressão de CO_2 (100 Pa) permanecendo nestas condições por 4 dias.

Após este período, o nível de CO₂ retornou para as condições ambiente (100 - 40 Pa) totalizando também 6 dias de tratamento.

In vivo, foram inicialmente avaliadas variáveis relacionadas com as trocas gasosas (P_N, g_s, E e C_i) e o influxo de NO₃⁻. A cada dois dias foram realizadas curvas A-Ci (nas mesmas folhas das medidas diárias de trocas gasosas) com o objetivo de obter os parâmetros (V_{cmax} e J_{max}) segundo (SHARKEY *et al.*, 2007). Para a determinação das limitações estomáticas (LS) e as limitações metabólicas (LM) foi seguido o método de Grassi e Magnani (2005). Ao final do experimento, foram avaliados o conteúdo relativo de água e o vazamento de eletrólitos. Posteriormente as folhas remanescentes foram coletadas na presença de N₂ líquido e armazenadas em freezer -80°C para análises posteriores. O efeito do elevado CO₂ na assimilação do carbono e do nitrogênio foi determinado através das seguintes análises: atividade da Rubisco, redutase do NO₃⁻ (RN) e glutamina sintetase (GS), conteúdo de nitrato e amônio, nitrogênio total e matéria fresca da parte aérea e raízes. Também foram determinados os teores de carboidratos, amido e sacarose.

4.3 Medidas de trocas gasosas e curvas A-Ci

Para as medidas de trocas gasosas foi utilizado um analisador de gás infravermelho – IRGA LI-6400XT (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). A fotossíntese líquida (P_N), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e pressão interna de CO₂ (C_i) foram mensuradas. A câmara do IRGA tinha os seguintes parâmetros internos: 1000 μmol m⁻² s⁻¹ PPFD, 1.0 ± 0.2 kPa VPD, 38 Pa de CO₂ e 28°C durante as mensurações. A quantidade de luz azul foi ajustada para 10% do PPFD para maximizar a abertura estomática (FLEXAS *et al.*, 2007).

Na curva A-Ci, a PPFD e a temperatura da câmara foram mantidas em 1000 μmol m⁻² s⁻¹ e 28°C, respectivamente, e a pressão interna de CO₂ teve uma variação de 0 a 120 Pa. Esta curva foi ajustada de acordo com o modelo proposto por (FARQUHAR *et al.*, 1980)

4.4 Determinação de clorofila e carotenóides

Para extração destes pigmentos, folhas frescas foram maceradas (aproximadamente 200 mg) com acetona 80% gelada, em almofariz de porcelana, sendo, posteriormente, os extratos filtrados em funil com papel e transferidas para tubos de ensaios (10 mL), protegidos da luz. Os teores dos pigmentos presentes nos extratos foram medidos, por meio de leituras de absorbâncias, em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 663 nm e 645 nm para os cálculos de clorofilas e 470 nm para o cálculo dos teores dos carotenóides. As concentrações foram calculadas conforme Lichtenthaler (1987), utilizando as seguintes equações, sendo expressas em mg g^{-1} MS:

$$\text{Clorofila a: } 12,23 A_{663} - 2,79 A_{645}$$

$$\text{Clorofila b: } 21,50 A_{645} - 5,10 A_{663}$$

$$\text{Carotenóides: } (1000 A_{470} - 1,82 \text{ Chl a} - 85,02 \text{ Chl b})/198.$$

4.5 Determinação do perfil de açúcares

O teor de carboidratos solúveis totais (CST) extraídos de folhas liofilizadas e em seguida incubadas em etanol 80%, foram mensurados de acordo com Dubois *et al.* (1956) na presença de fenol e ácido sulfúrico. O conteúdo de sacarose e amido foram medidos utilizando os métodos descritos por Van Handel (1968) e Mc Cready *et al.* (1950), respectivamente. O material vegetal liofilizado foi incubado com solução de MCW (metanol, clorofórmio e água 12:5:3) por 1 h a 25°C e em seguida centrifugados (10.000 g por 10 min). O sobrenadante foi coletado e submetido à separação de fase pela adição da extração de sacarose incubada com HClO_4 30% por 1 h a 25°C, centrifugado a 10.000 g por 10 min e o sobrenadante foi coletado para quantificação do amido, sendo expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

4.6 Determinação das atividades enzimáticas

O material vegetal estocado em freezer -80°C foi pesado e macerado na presença de N₂ líquido e tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 contendo 1mM de ácido etileno diamino tetraacético (EDTA). Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 14.000 g por 30 min, e o sobrenadante foi coletado para a quantificação das atividades enzimáticas. Todos os processos de extração foram realizados em condições de baixa temperatura (4°C).

Para a atividade da Rubisco, o meio de extração foi de bicina – NaOH 100 mM pH 8,0, diotiotreitol (DTT) 1 mM, albumina de soro bovino (BSA) 0,1%, polivinilpirrolidona (PVP-40) 1,5%, ácido n-amino capróico 3,3 mM, benzamida 0,7 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 1 mM e NaHCO₃ 150 mM. A atividade foi medida espectrofotometricamente pela taxa de oxidação de NADH a 340 nm (SAGE *et al.*, 1988; REID *et al.*, 1997). O tampão de ensaio foi mantido a 25°C e consistia em bicina 100 mM pH 8,0, KHCO₃ 25 mM, MgCl₂ 20 mM, ATP 3,5 mM, fosfocreatina 5 mM, 80 nkat de desidrogenase G-3-P, 80 nkat de 3-fosfoglicerato fosfoquinase, 80 nkat de creatina fosfoquinase e NADH 0,25 mM. Para a atividade inicial, o extrato foi adicionado em 900 µL de tampão de ensaio e a reação foi iniciada com a adição de RuBP 0,5 mM. Para a atividade total, o extrato foi incubado a 25°C com o meio de reação por 15 minutos, para a ativação completa de Rubisco na solução de ensaio. Em seguida, foi adicionada RuBP 0,5 mM para início da reação. Nas duas situações, o decaimento da absorbância do NADH foi acompanhado por 300 s a 340 nm e o cálculo da concentração foi realizado por meio do coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,23$).

A atividade da RN é geralmente estimada medindo-se a quantidade de nitrito (NO₂⁻) produzido a partir do nitrato (NO₃⁻). O método utilizado para a determinação do nitrito (SNELL; SNELL, 1949) é baseado na formação de um sal de diazônio durante a reação em meio ácido com a sulfanilamida. Este complexo reage com o N-1-naftil etilenodiamina bicloridrato (NNEDA) formando um complexo colorido róseo, e possui máximo de absorção a 540 nm. O meio de incubação, consistiu de tampão fosfato (KH₂PO₄) 0,1M pH 7,5 contendo isopropanol (1,0% v/v), KNO₃ (50 mol.m⁻³) e cloranfenicol (15 mg.L⁻¹); sulfanilamida (1,0% p/v) em HCl 2,4 N e NNEDA (0,02% p/v).

4.7 Determinação do teor de proteínas solúveis totais e aminoácidos

As proteínas dos extratos enzimáticos dos tecidos foliares foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando a (BSA) como padrão nos mesmos extratos utilizados para os ensaios enzimáticos e expressos em mg g^{-1} MS. As amostras foram diluídas com tampão de extração na proporção de 1:100 em folhas, a partir da qual foi retirada uma alíquota de 0,1 mL para ser acrescida de 2,5 mL do reagente Comassie G-250 em temperatura ambiente por quinze minutos. As leituras foram realizadas em 595 nm.

Para determinação do teor de aminoácidos os extratos de folhas diluídos em água pura, em um volume final de 1 mL, foram acrescidos de 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M com pH 5,0, 0,2 mL de reativo de ninhidrina 5% e 1 mL de KCN 2% (v/v), ambos dissolvidos em éter monometílico de etilenoglicol. Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para o banho-maria a 100°C por 20 minutos. Em seguida, foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente e após foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60%, completando o volume para 4 mL e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões de leucina (0 - 200 nmol) e das amostras foram medidas a 570 nm, sendo feitas três repetições para cada amostra e o teor de aminoácidos solúveis totais foi expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS (YEMM; COCKING, 1955).

4.8 Determinação do influxo de nitrato, conteúdo de nitrato e nitrogênio total

O influxo de NO_3^- foi determinado através da diferença entre a concentração inicial menos a concentração final de NO_3^- das soluções contidas nos vasos. Posteriormente, os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

A determinação do conteúdo de nitrato foi obtida pelo método do ultravioleta, em que alíquotas de 50 μL da solução foram adicionadas com 450 μL de água deionizada e transferidas em tubos de ensaio contendo 2 mL de ácido perclórico 5%. O método utilizado foi o de Cawse (1967). Após a mistura da amostra + ácido perclórico, a mesma foi agitada vigorosamente com agitador tipo vortex.

Após, foram realizadas as leituras em ultravioleta por espectrofotometria na faixa de 210 nM.

Para determinar a concentração de amônio nas folhas, foi utilizado material liofilizado para extração com água deionizada (50 mg MS/5 mL) a 100°C por 30 minutos e centrifugados a 5.000 g por 10 min. O líquido extraído foi utilizado para a determinação da concentração de amônio (WEATHERBURN, 1967).

4.9 Determinação do conteúdo relativo de água (CRA) e dano de membrana

A determinação do conteúdo relativo de água (CRA) foi realizada de modo análogo ao trabalho realizado por Cairo (1995). Em seguida, o peso fresco dos discos foi determinado e imediatamente foram postos em placas de Petri contendo 10 mL de água deionizada. Estas placas contendo os discos foram mantidas à temperatura de 25°C. Decorridas 24 horas da exposição, os discos foliares foram enxugados com o auxílio de papel de filtro, visando eliminar o excesso de água superficial, e em seguida pesados para a obtenção do peso túrgido. Para peso seco, os discos foliares foram submetidos a 70°C por 72 h. A partir dos valores de peso fresco (PF), peso seco (PS) e peso túrgido (PT) dos

discos foliares, e pelo emprego da equação $CRA = ([PF - PS]/[PT - PS] \times 100)$ foi determinado o CRA da folha.

O dano de membrana foi analisado de acordo com Cavalcanti *et al.*, (2004). Foram extraídos discos foliares com um perfurador cilíndrico de base com diâmetro de 10 mm, de folhas provenientes de plantas de cada tratamento, inclusive da transição. Os discos foram imersos em 10 mL de água deionizada em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram fechados e mantidos à temperatura de 25°C por seis horas sob agitação constante. Após a incubação, a condutividade inicial (Li) do meio foi determinada usando um condutivímetro de bancada. Posteriormente, as amostras foram submetidas a 100°C por 60 minutos e a condutividade medida novamente (Lf). O vazamento de eletrólitos foi expresso como a porcentagem de condutividade em relação à condutividade total após o tratamento por 60 minutos a 100°C $[(Li/Lf) \times 100]$.

4.10 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi em esquema fatorial (2 x 4), com dois níveis de CO₂ (40 e 100 Pa), quatro períodos de coleta (0, 2, 4 e 6 dias) e adicionalmente um lote foi submetido a 2 dias de transição para a condição ambiente (100 – 40 Pa), com três repetições, totalizando 24 unidades amostrais.

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento das plantas sob condições de elevado CO₂ (100 Pa) foi reduzido, quando comparadas com o seu respectivo controle (40 Pa)(figura 4), informação demonstrada pela matéria fresca total e foliar das plantas (tabela 1). Estes resultados quantitativos foram corroborados pelo observado visualmente (figura 4). Provavelmente, esta limitação no crescimento e na biomassa da parte aérea das plantas de soja seja decorrente da sub-regulação da fotossíntese pelo elevado CO₂, uma vez que a biomassa vegetal está diretamente relacionada com a assimilação fotossintética de CO₂ (ELLSWORTH *et al.*, 2004). No entanto, segundo Li (2013) o aumento na biomassa do sistema radicular presente nas plantas expostas ao elevado CO₂ pode ser um mecanismo de adaptação com o objetivo de aumentar a área de captação de nutrientes, principalmente o nitrato. Estudos do mesmo autor com altos níveis de CO₂ demonstraram incrementos na biomassa do sistema radicular de soja.

Figura 4 - Comparação do crescimento entre as plantas de soja expostas a CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e transição de CO₂ (de 100 para 40 Pa (TD)).

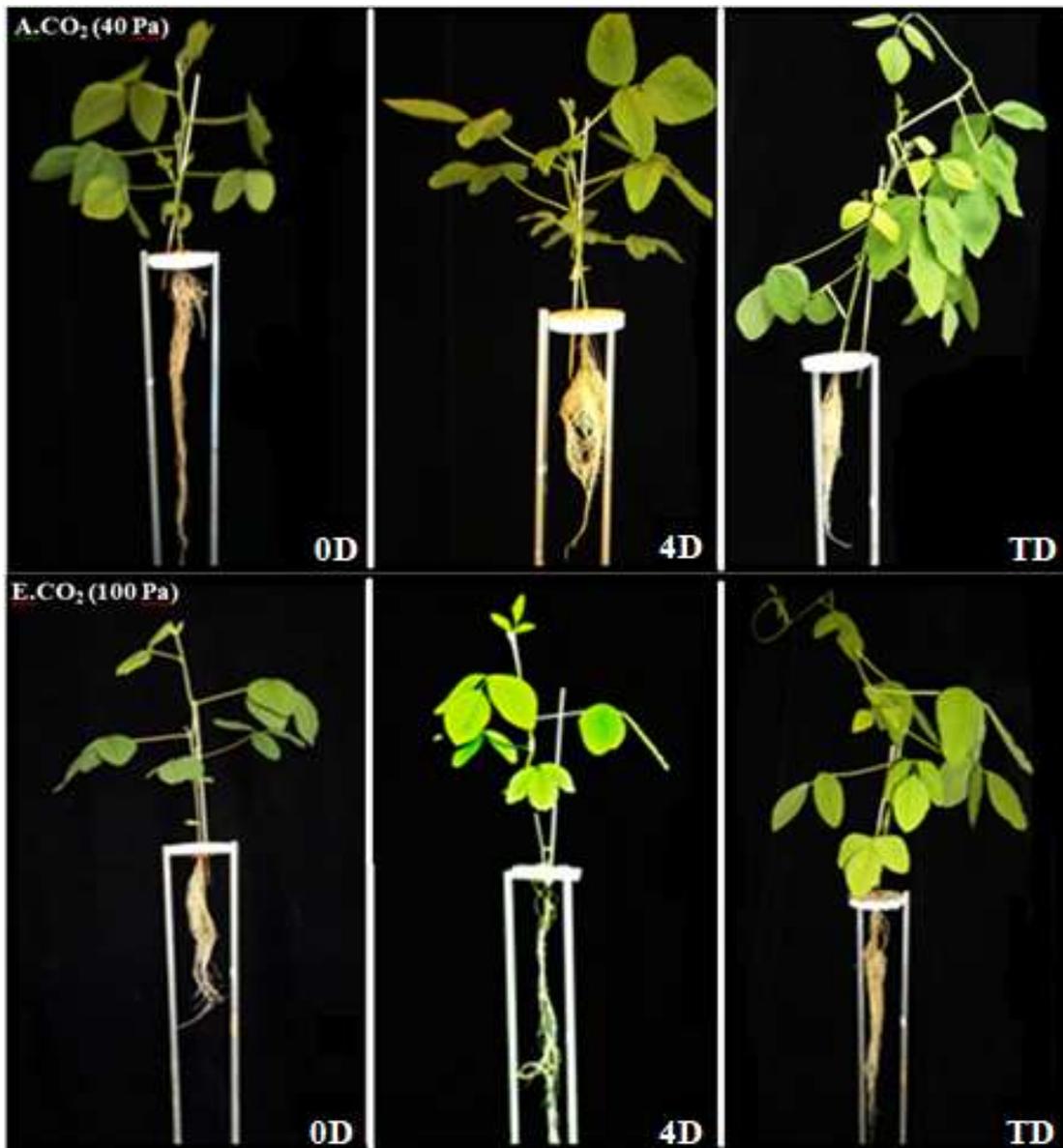


Tabela 1 - Matéria fresca total (MF Total), foliar (MF Foliar) e de raízes (MF Raízes) em plantas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para o CO₂ ambiente ((td):100-40 Pa).

Níveis de CO ₂	Parâmetros	Dias			
		0	2	4	6
Ambiente	MF Total ⁽¹⁾	17.11 Ad	21.62 Ac	25.00 Ab	29.61 Aa
	MF Foliar ⁽¹⁾	13.30 Ad	17.63 Ac	20.50 Ab	24.40 Aa
	MF Raiz ⁽¹⁾	3.82 Ac	4.24 Bb	4.52 Bb	5.20 Ba
Elevado	MF Total ⁽¹⁾	-----	18.70 Bc	23.81 Bb	(td) 29.61 Aa
	MF Foliar ⁽¹⁾	-----	13.12 Bc	18.00 Bb	(td) 22.62 Ba
	MF Raiz ⁽¹⁾	-----	5.60 Ab	5.80 Ab	(td) 7.00 Aa

⁽¹⁾ (g planta⁻¹).

*Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de CO₂ atmosférico e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de exposição pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os conteúdos de clorofila e carotenóides sofreram pequenas reduções sob condições de elevado CO₂ (100 Pa) (tabela 2). Segundo Nie *et al.* (1995) estas reduções podem indicar uma restauração do aparato fotossintético, inferindo-se que a senescência nas folhas de soja é acelerada pelo alto nível de CO₂. Já no conteúdo relativo de água houve uma pequena redução de 5% e 8% nos períodos de 2 e 4 dias sob elevado CO₂, respectivamente, quando comparadas com a condição controle. Em contrapartida, não houve aumento no conteúdo relativo de água após o período de transição (100 – 40 Pa) (tabela 2). O dano de membrana sofreu variações superiores nas plantas sob elevado CO₂ atingindo incrementos de 10% e 23% para o período de 2 e 4 dias, respectivamente. Dados semelhantes foram obtidos por Van Oijen *et al.* (1998), os mesmos especulam que essa resposta resulta de um aumento da temperatura foliar, devido ao fechamento parcial dos estômatos sob altos níveis de CO₂.

Tabela 2 - Clorofila, carotenóides, conteúdo relativo de água (CRA) e dano de membrana (DM) em plantas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para as condições ambiente ((td):100-40 Pa).

Níveis de CO ₂	Parâmetros	Dias			
		0	2	4	6
Ambiente	Clorofila ⁽¹⁾	1.51 Aa	1.50 Aa	1.51 Aa	1.51Aa
	Carotenóides ⁽¹⁾	1.71 Ab	1.73 Aa	1.70 Ab	1.71Ab
	CRA ⁽²⁾	95.41 Aa	94.90 Aa	95.31 Aa	94.13Aa
	DM ⁽²⁾	14.32 Ac	14.51 Ba	15.30 Ba	15.22Ba
Elevado	Clorofila ⁽¹⁾	-----	1.48 Bb	1.47 Bb	(td) 1.50 Aa
	Carotenóides ⁽¹⁾	-----	1.70 Ba	1.69 Aa	(td) 1.71 Aa
	CRA ⁽²⁾	-----	90.40 Bb	87.72 Bc	(td) 88.11Bc
	DM ⁽²⁾	-----	16.13 Ab	18.81 Aa	(td) 18.00 Aa

⁽¹⁾ (mg g⁻¹ MS); ⁽²⁾ (%).

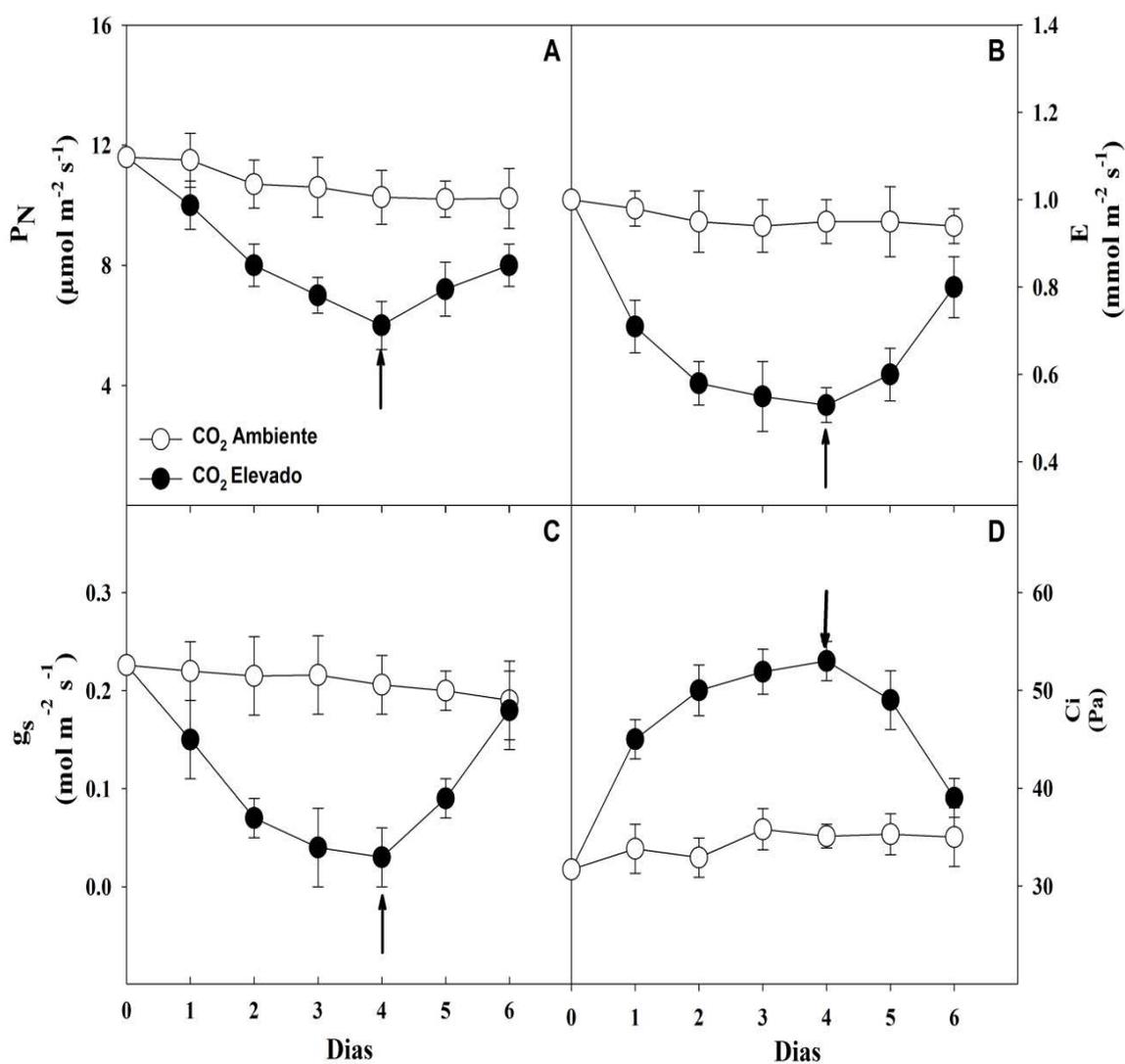
*Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de CO₂ atmosférico e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de exposição pelo teste de Tukey (P<0,05).

A assimilação fotossintética de CO₂ foi fortemente afetada pela exposição à elevada concentração de CO₂ atmosférico. Na condição de elevado CO₂ a fotossíntese líquida (P_N) sofreu uma forte limitação chegando a uma redução de 48% no 4º dia. Após a transição dessas plantas para a concentração ambiente, houve uma recuperação de 69% do valor inicial da fotossíntese líquida (figura 5A). A transpiração foliar (E) apresentou um comportamento semelhante ao da P_N, com uma limitação acentuada ao longo do período de exposição ao elevado CO₂ atingindo uma redução máxima de 47% no 4º dia. Na transição, as plantas recuperaram até 80% do seu nível de controle (figura 5B).

Possivelmente, as alterações na E foram uma consequência da condutância estomática (g_s), que foi reduzida em 86% no 4º dia de exposição a CO₂ elevado, com uma recuperação de 80% após retornar para as condições de CO₂ ambiente (figura 5C). Com o aumento na concentração atmosférica de CO₂ (40-100 Pa, a partir do 1º dia) e a forte limitação na capacidade fotossintética (P_N), a concentração intercelular de CO₂ foi aumentada progressivamente chegando a atingir um incremento de 1,7 vezes no 4º dia e, ao mesmo modo, foi praticamente reduzido ao nível do controle após a transição para as condições ambiente (figura 5D). Estes resultados podem ser indicações de que a fotossíntese está sendo limitada não só por fatores estomáticos, como também por limitações metabólicas (LAWLOR; CORNIC, 2002). Alguns autores correlacionam as mudanças no Ci para distinguir as limitações estomáticas das

metabólicas na fotossíntese (ORT *et al.*, 1994), onde os fatores estomáticos estão presentes na primeira fase que geralmente apresenta decréscimo de C_i acompanhado pelo decréscimo de g_s , e os metabólicos nas fases mais severas, com aumento de C_i e decréscimo contínuo da fotossíntese (DU *et al.*, 1996).

Figura 5 - Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (B), condutância estomática (C) e pressão parcial de CO_2 (D) em folhas de soja sob condições de CO_2 ambiente (40 Pa) e CO_2 elevado (100 Pa). A seta indica a transição de CO_2 de 100 para 40 Pa. Cada ponto representa a média de três repetições ($\pm DP$).



As curvas A-Ci foram reduzidas pelo aumento na concentração de CO₂ atmosférico, principalmente para o período de 4 dias (4D) (figura 6). Os parâmetros V_{cmax} e J_{max} estimados a partir destas curvas foram todos fortemente reduzidos pela exposição a elevado CO₂. Contudo, houve um incremento nas limitações estomáticas e metabólicas (tabela 3). A velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}) reduziu cerca de 80% após quatro dias de exposição enquanto que a taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}) reduziu 45%. Já as limitações estomáticas e metabólicas (L_s e L_m) apresentaram um incremento de aproximadamente 28% e 42% após quatro dias, quando comparadas com o seu respectivo controle (tabela 3).

O forte decréscimo no V_{cmax} indica que o elevado CO₂ está limitando de forma mais rápida a velocidade de carboxilação da Rubisco. Esta limitação poderia estar sendo desencadeada pela maior necessidade de nitrogênio para os componentes da Rubisco do que para os transportadores de elétrons (YAMORY, 2011). Consequentemente corrobora com um dos três modelos de aclimação encontrados por Ainsworth (2007). Todavia, o grau de resposta destas variáveis depende de vários fatores, como das espécies de plantas (ETHIER, 2008), duração da exposição ao alto CO₂ (ZHOU, 2011) e do suprimento de N (CROUS, 2008).

Figura 6 - Curvas de assimilação de CO₂ em respostas a pressão parcial intercelular de CO₂ em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa) e elevado CO₂(100 Pa: por dois e quatro dias). Cada ponto representa a média de três repetições (\pm DP).

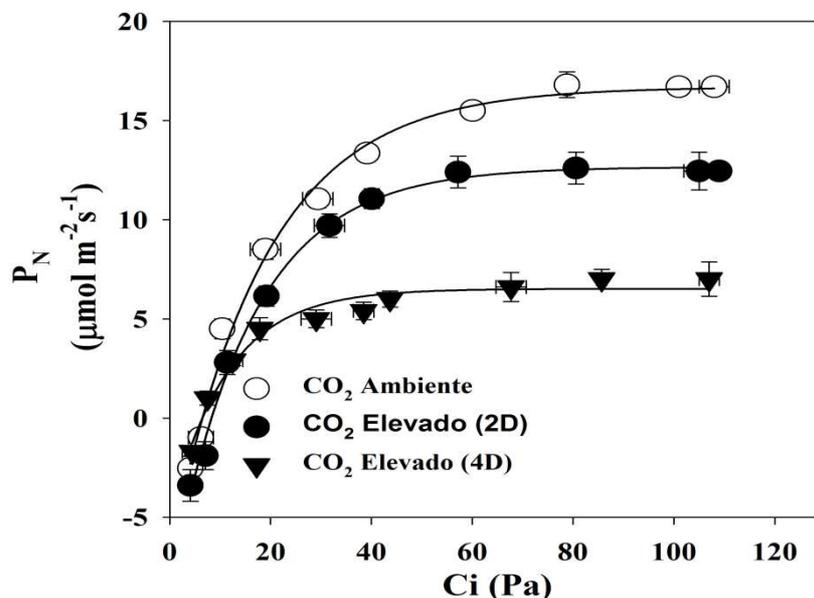


Tabela 3 - Parâmetros associados com a eficiência fotossintética calculados a partir das curvas A-Ci em plantas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa) e CO₂ elevado (100 Pa). V_{cmax}: velocidade máxima de carboxilação; J_{max}: taxa máxima de transporte de elétrons; Ls: limitação estomática e Lm: limitação metabólica.

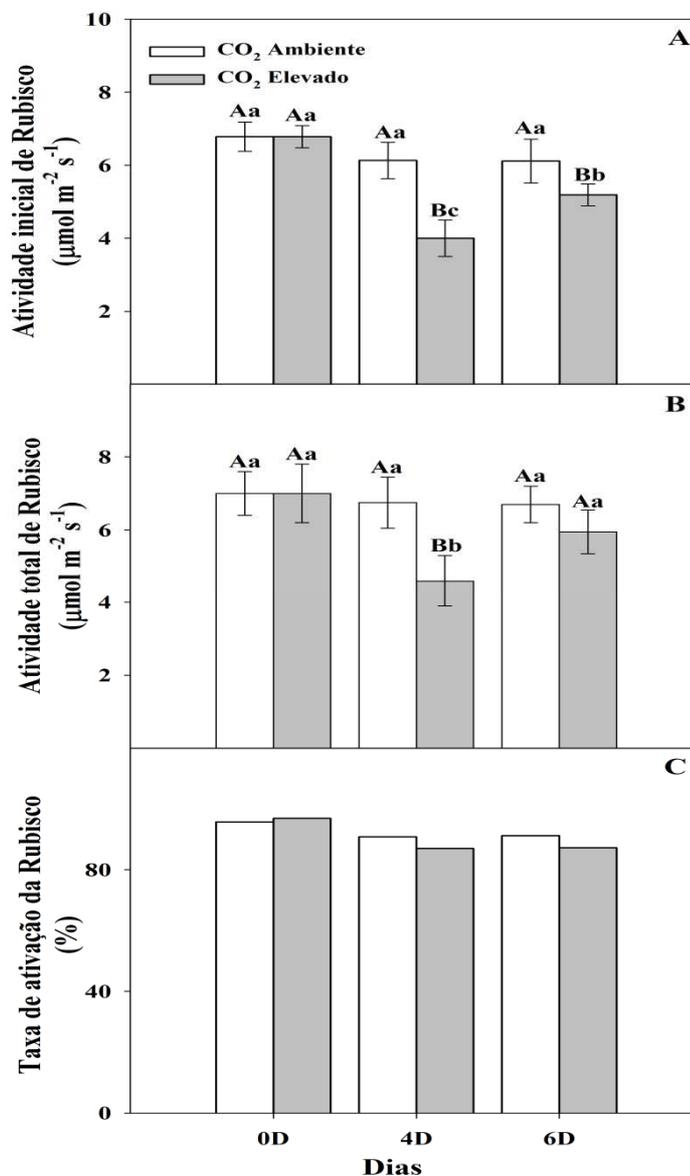
Níveis de CO ₂	Parâmetros	Dias		
		0	2	4
Ambiente	V _{cmax} ⁽¹⁾	196.40 Aa	169.21 Ab	122.50 Ac
	J _{max} ⁽¹⁾	98.81 Aa	97.42 Aa	74.51 Ab
	Ls ⁽²⁾	15.00 Aa	10.00 Bb	9.72 Bb
	Lm ⁽²⁾	13.30 Ab	13.21 Bb	15.00 Ba
Elevado	V _{cmax} ⁽¹⁾	-----	60.20 Bb	39.62 Bc
	J _{max} ⁽¹⁾	-----	71.30 Bb	54.21 Bc
	Ls ⁽²⁾	-----	16.20 Ab	18.52 Aa
	Lm ⁽²⁾	-----	17.11 Ab	32.20 Aa

⁽¹⁾($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); ⁽²⁾(%).

*Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de CO₂ atmosférico e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de exposição pelo teste de Tukey (P<0,05).

A atividade inicial e a total da Rubisco decresceram 44% e 34%, respectivamente, nas plantas expostas por quatro dias a elevada pressão de CO₂ atmosférico, levando a uma redução de 9% no estado de ativação da enzima. Entretanto, a atividade inicial e total recuperaram 74% e 84%, respectivamente, quando comparadas com a condição controle, após a transição para as condições de CO₂ ambiente (100-40 Pa) (figura 7). Segundo Fukayama *et al.* (2009) a redução na atividade da Rubisco pode ser causada por (i) um declínio no teor da proteína Rubisco, (ii) inibição da enzima carbomiladora, ou (iii) um aumento na proporção das formas inativas não carbomiladoras da Rubisco.

Figura 7 - Atividade inicial (A), total (B) e estado de ativação (C) da Rubisco em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (0D: 40 Pa) e CO₂ elevado (4D: 100 Pa) e transição de CO₂(6D:100-40 Pa). Cada ponto representa a média de três repetições (\pm DP).



O perfil de açúcares não sofreu alteração quando as plantas permaneceram sob condições de CO₂ ambiente, porém exibiu grande decréscimo quando expostas a elevado CO₂ (tabela 4). O conteúdo de amido, carboidratos e sacarose sofreram reduções de 35%, 31% e 31%, respectivamente, após quatro dias de exposição ao elevado CO₂. Após o período de transição (td) recuperou 71%, 74% e 84% do seu valor inicial de amido, carboidrato e sacarose, respectivamente (tabela 4). A redução no perfil de açúcares nas plantas expostas a elevado CO₂ atesta que a modulação negativa na atividade de Rubisco nem sempre é correlacionada com o aumento

no conteúdo de açúcares (MOORE *et al.*, 1999), uma vez que os carboidratos possuem diferentes funções na célula (desde estoque energético a sinalizadores), e as plantas os utilizam como estratégia para se adaptarem a vários estresses ambientais (KOHORN, 2001).

Tabela 4 - Conteúdo de amido, carboidratos e sacarose em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para as condições ambiente ((td):100-40 Pa).

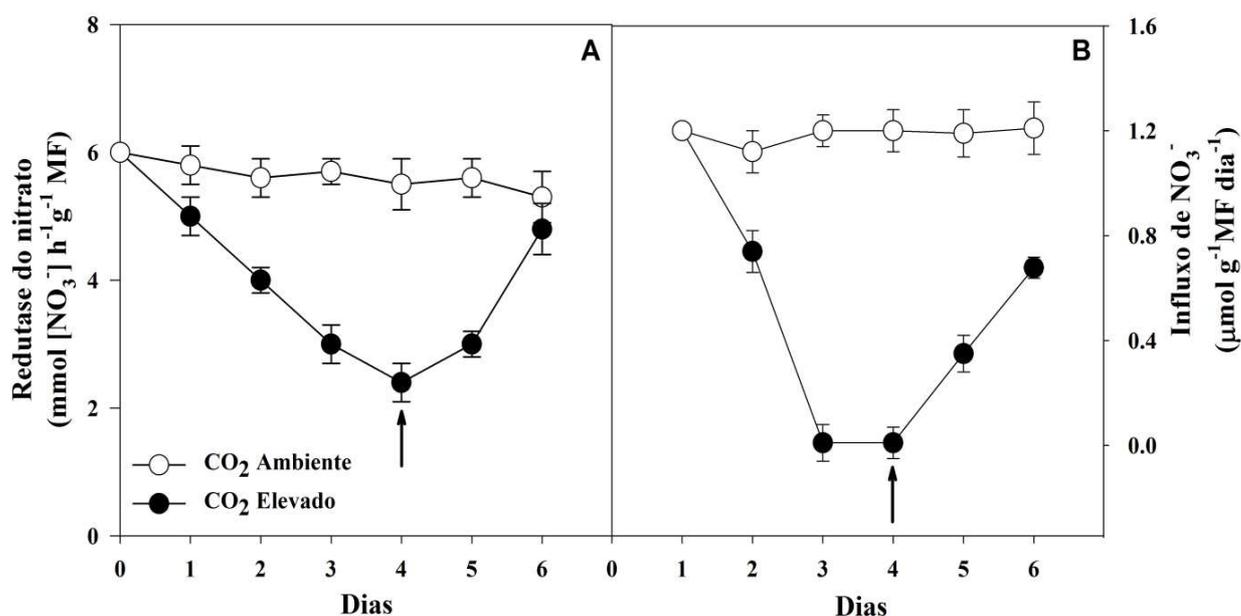
Nível de CO ₂	Parâmetros	Dias			
		0	2	4	6
Ambiente	Amido ⁽¹⁾	373.65 Aa	372.21 Aa	371.90 Aa	372.34 Aa
	AST ⁽¹⁾	35.43 Aa	35.78 Aa	34.65 Aa	35.45 Aa
	Sacarose ⁽¹⁾	32.48 Aa	31.43 Aa	31.32 Aa	31.45 Aa
Elevado	Amido ⁽¹⁾	-----	267.56 Bb	241.19 Bd	(td) 265.26 Bc
	AST ⁽¹⁾	-----	26.7 Bb	24.10 Bc	(td) 26.50 Bb
	Sacarose ⁽¹⁾	-----	26.25 Bb	21.93 Bc	(td) 26.88 Bb

⁽¹⁾ (μmol g⁻¹ MS).

*Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de CO₂ atmosférico e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de exposição pelo teste de Tukey (P<0,05).

O comportamento da RN seguiu o mesmo padrão da fotossíntese (P_N), apresentando uma forte inibição ao longo do tratamento com elevado CO_2 quando comparada com a condição controle, chegando a uma redução máxima de 64% após quatro dias de exposição ao elevado CO_2 . Contrariamente, após o período de transição para as condições ambiente, a atividade da RN recuperou 90% da sua capacidade inicial (figura 8A). Já o influxo do nitrato sofreu uma inibição total após o terceiro dia de alto CO_2 , mas após o período de transição retornou para aproximadamente 65% (figura 8B). A inibição na atividade da RN em condições de elevado CO_2 foi controlada pelo influxo de NO_3^- , uma vez que a redução do nitrato é controlada pela absorção radicular, e altos níveis de CO_2 influenciam diretamente a absorção radicular (BLOOM *et al.*, 2014).

Figura 8 - Atividade da redutase do nitrato (A) e influxo de nitrato (B) em folhas de soja sob condições de CO_2 ambiente (40 Pa) e CO_2 elevado (100 Pa). A seta indica (o dia da transição de CO_2 : 100-40 Pa). Cada ponto representa a média de três repetições ($\pm DP$).



As plantas de soja que permaneceram sob CO₂ ambiente não sofreram alterações no seu conteúdo de nitrogênio total, nitrato, aminoácidos e proteínas, porém, quando expostas ao elevado CO₂ apenas o conteúdo de nitrogênio total não sofreu variação. Enquanto que o conteúdo de nitrato apresentou um aumento progressivo atingindo um incremento de 44% após quatro dias de exposição ao elevado CO₂. E os níveis de aminoácidos e proteínas sofreram reduções de 44% e 17%, respectivamente (tabela 5).

O aumento no conteúdo de nitrato nas folhas de soja sob alta concentração de CO₂ poderia estar associado com o comportamento da RN, uma vez que a sua inibição resultou em um acúmulo de NO₃⁻ no tecido foliar. No entanto, este parâmetro não é tão confiável, pois existem dois pools de nitrato: o de armazenamento presente no vacúolo e o metabólico associado diretamente com a atividade da RN (MARTINOVA *et al.*, 1981). A redução no conteúdo de aminoácidos e proteínas (tabela 5) nas folhas de soja pode estar associada com a inibição na redução do nitrato em condições de elevado CO₂ (HÖGY *et al.*, 2009).

Tabela 5 - Conteúdo de nitrogênio total, nitrato, aminoácidos e proteínas solúveis em folhas de soja sob condições de CO₂ ambiente (40 Pa), CO₂ elevado (100 Pa) e de transição para a condição ambiente ((td):100-40 Pa).

Níveis de CO ₂	Parâmetros	Dias			
		0	2	4	6
Ambiente	N-total ⁽¹⁾	39.20 Aa	39.10 Aa	39.30 Aa	38.50 Aa
	Nitrato ⁽²⁾	15.31 Aa	15.10 Aa	15.43 Ba	15.31 Ba
	Aminoácidos ⁽³⁾	564.00 Aa	563.11 Aa	562.30 Aa	562.82 Aa
	Proteínas solúveis ⁽⁴⁾	96.41 Aa	95.32 Aa	94.35 Aa	95.52 Aa
Elevado	N-total ⁽¹⁾	-----	40.33 Aa	40.51 Aa	(td) 39.80 Aa
	Nitrato ⁽²⁾	-----	16.10 Ac	22.71 Aa	(td) 18.70 Ab
	Aminoácidos ⁽³⁾	-----	402.11 Bc	317.62 Bd	(td) 536.40 Bb
	Proteínas solúveis ⁽⁴⁾	-----	92.13 Bb	80.54 Bd	(td) 88.31 Bc

⁽¹⁾ (mg N g⁻¹ MS); ⁽²⁾ (μmol NO₃⁻¹ g⁻¹ MS); ⁽³⁾ (μmol g⁻¹ MS) e ⁽⁴⁾ (mg g⁻¹ MS).

*Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de CO₂ atmosférico e diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de exposição pelo teste t (P<0,05).

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a hipótese foi aceita, uma vez que, a atividade fotossintética e a assimilação do nitrogênio são moduladas negativamente por elevado CO_2 . Controladas principalmente por limitações estomáticas, metabólicas e uma forte inibição na atividade da RN. Isto pode ser atribuído à forte redução na condutância estomática e ao incremento na concentração interna de CO_2 , desencadeando reduções na velocidade de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e na taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}). A forte limitação estomática e a conseqüente redução na transpiração foliar promovida pelo elevado CO_2 reduziram completamente o influxo do nitrato, e subsequentemente, inibiu a atividade da RN. Assim, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de elucidar outros mecanismos integrando os gastos de energia e de poder redutor pelo ciclo de Calvin, com outras etapas da assimilação do nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, E.A.; ROGER, A.; VODKIN, L.O.; WALTER, A.; SCHURR, U. The effect of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. **Plant Physiology**. v.142, p.135-147. 2006.
- AINSWORTH, E.A. ROGERS, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. **Plant Cell Environ.** v.30, p.258-270. 2007.
- ASSMANN, S.M. Signal transduction in guard cells. **Annu. Rev. Cell Biol.** v.9, p.345-375. 1993.
- BACKHAUSEN, J.E.; EMMERLICH, A.; HOLTGREFE, S.; HORTON, P.; ROGERS, J.J.M. Transgenic potato plants with altered expression levels of chloroplast NADP-malate dehydrogenase: interactions between photpsynthetic electron transport and malate metabolism in leaves and in isolated intact chloroplasts. **Plant**. v.207, p.105-114.2000.
- BACHMANN, M.; McMICHAEL, R.N.; HUBER, J.L. Partial purification and characterization of a calcium – dependent protein kinase and an inhibitor protein required for the activation of spinach leaf nitrate reductase. **Plant Physiology**. v.108, p.1083-109. 1995.
- BEEVERS, L., HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v.20, p.495-522, 1969.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA , G. M. S. (Ed.). Soja: tecnologia de produção II. Piracicaba: **ESALQ**. p.1-18. 2000.
- BLOOM, A.J.; BURGER, M.; KIMBALL, B.A. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. **Nature**. 2014.
- BLOOM, A.J.; BURGER, M. J.; ASENSIO, S.R.; COUSINS, A.B. Carbon Dioxide Enrichment Inhibits Nitrate Assimilation in Wheat and *Arabidopsis*, **Science**, v.328, p. 899. 2010.
- BLOOM, A. J. *et al.* CO₂ enrichment inhibits shoot nitrate assimilation in C₃ but not C₄ plants and slows growth under nitrate in C₃ plants. **Ecology**. v. 93, p.355-367. 2012.
- BLOOM, A.J. Nitrogen as a limiting factor: crop acquisition of ammonium and nitrate. In: JACKSON, L.E.(ED.). **Ecology in agriculture**. San diego: Academic Press. p.145-172. 1997.
- BLOOM, A.J.; SMART, D.J.; NGUYEN, D.T.; SEARLES, P.S. Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. **Plant Biology**. v.99, p.1730-1735. 2002.

BLOOM, A .J.; SUKRAPANNA, S.S.; WARNER, R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v.99, p. 1294-1301, 1992.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo : origem, história e distribuição. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). A soja no Brasil. Campinas : **ITAL**. p. 1-6.1981.

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

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 30, n.2, p. 365-372. 2000.

BUNCE, J.A. Direct and acclamatory responses of stomatal conductance to elevated carbon dioxide in four herbaceous crop species in the field, **Global Change Biology**. v. 7, p. 323-331. 2001.

CAIRO, P.A.R. **Relações hídricas de plantas**. Vitória da Conquista: UESB, 1995. 32p.

CÂMARA, G. M. S. Ecofisiologia da cultura da soja. In: CÂMARA, G. M. S.; MARCOS FILHO, J.; OLIVEIRA, E. A. M. (Org.) SIMPÓSIO SOBRE CULTURA E PRODUTIVIDADE DA SOJA. Piracicaba-SP, 1991. **Anais**. Piracicaba-SP: CÂMARA, G.M.S.; MARCOS FILHO, J.; OLIVEIRA, E.A.M. (Ed.), P. 129-142. 1992.

CÂMARA, G. M. S. Fenologia da soja. In: Câmara, G. M. S. ed. Soja: tecnologia da produção. Piracicaba: Editora Publique, p. 26-39.1998a.

CAMARGOS, L. S. Análises das alterações no metabolismo de nitrogênio em *Canavalia ensiformes* (L) em respostas a variações na concentração de nitrato fornecida. Piracicaba: **ESALQ**. p.113. 2002.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. Annual Review Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v.50, p.277-303. 1999.

CAWSE, P.A. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. **Analyst**. v.92, p.311-315. 1967.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, primeiro levantamento, outubro 2013. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_08_12_38_56_boletim_portugues_outubro_2013.pdf Acesso em: 01 fev 2014.

COSTA-NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v.23, p. 4. 2000.

COUSINS, A. B.; BLOOM, A. J. Influence of elevated CO₂ and nitrogen nutrition on photosynthesis and nitrate photo-assimilation in maize (*Zea mays* L.) **Plant Cell Environ.** v.26, p.1525-1530. 2003.

CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T. et al. Nitrogen and sulfur In:BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**. Cap. 16, p.786-849. 2000.

CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, p.859-868, 1995.

CROUS, K.Y.; WALTERS, M.B.; ELLSWORTH, D.S. Elevated CO₂ concentration affects leaf photosynthesis-nitrogen relationships in *Pinus taeda* over nine years in FACE. **Tree Physiol.** v. 28, p. 607-614. 2008.

CURTIS, P. E.; OGREN, W. L.; HAGEMAN, R. H. Varietal effects in soybean photosynthesis and photorespiration. **Crop Science**, v. 9, n. 3, p. 323-327, 1969.

DECKHARD, E.L., LAMBERT, R.J., HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in corn leaves as related to yields of grain and grain protein. **Crop Science**, Madison, v.13, p.343-350, 1973.

DRAKE, B.G.; GONZÁLEZ-MELER, M.A.; LONG, S.P. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? **Annu Rev Phys.** v.48, p.609-639. 1997.

DU, Y. C.; KAWAMITSU, Y.; NOSE, A.; HIYANE, S.; MURAYAMA, S.; WASANO, K.;UCHIDA, Y. Effects of water stress on carbon exchanger rate and activities of photosynthetic enzymes in leaves of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Australian Journal of plant Physiology.** v.23, p.719-726. 1996.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356. 1956.

DUKES, J. S. CHIARIELLO, N.R.; CLELAND, E.E. Responses of grassland production to single and multiple global environmental changes. **PloS Biol.** v.3, 1829-1837. 2005.

EICHELBERG, K.D., LAMBERT, R.J., BELOW, F.E., et al. Divergent phenotypic recurrent selection for nitrate reductase in maize. I. Selection and correlated responses. **Crop Science**, Madison, v.29, p.1393-1397, 1989.

ETHIER, G.J.; LIVINGSTON, N.J.; HARRISON, D.L.; BLACK, T.A.; MORAN, J.A. Low stomatal and internal conductance to CO₂ versus Rubisco deactivation as determinants of the photosynthetic decline of ageing evergreen leaves. **Plant Cell Environ.** v. 29, p. 2168-2184. 2008.

FAKOREDE, M.A.B., MOCK, J.J. Nitrate-reductase activity and grain yield of maize cultivar hybrids. **Crop Science**, Madison, v.18, p.680-682, 1978.

FARQUHAR G, VON CAEMMERER S, BERRY JA. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. **Planta** 149:78–90. doi:10.1007/BF0038623. 1980.

FENTEM, P.A., LEA, P.J., STEWART, G.R. Ammonia assimilation in the roots of nitrate- and ammonia-grown *Hordeum vulgare* (cv Golden Promise). **Plant Physiology**, Lancaster, v.71, p.496-501, 1983.

FLEXAS, J.; DIAS-ESPEJO, A.; GALMÉS, J.; KALDENHOFF, R. MEDRANO, H.; RIBAS-CARBO, M. Rapid variations of mesophyll conductance in responses to changes in CO₂ concentrations around leaves. **Plant, cell and environment**, v.30, p.1284-1298. 2007.

FOYER, C.H., BLOOM, A.J., QUEVAL, G., NOCTOR, G. Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 60, p. 455-484. 2009.

FREITAS, M.C.M. A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**. 2011.

FUKAYAMA, H. T.; FUKUDA, C.; MASUMOTO, Y.; TANIGUCHI, H.; SAKAI, W.G.; CHENG, T.; HASEGAWA, M. Rice plant response to long term CO₂ enrichment: gene expression profiling. **Plant Science**. v.177, p.203-210. 2009.

GRASSI G, MAGNANI F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. **Plant Cell Environ** 28:834–849. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01333. 2005.

HAGEMAN, R.H., LAMBERT, R.J. The use of physiological traits for corn improvement. In: SPRAGUE, G.F., DUDLEY, J.W. Corn and corn improvement. 3 ed. Madison : ASA/CSSA. Cap.7. p.431-461. 1988.

HAGEMAN, R.H., LENG, E.R., DUDLEY, J.W. A biochemical approach to corn breeding. *Advances in Agronomy*, New York, v.19, p.45-86, 1967.

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J., BENNETT. J.M., SINCLAIR, T.R., et al. Physiology and determination of crop yield. Madison : ASA/CSSA/SSSA. Chapt.11A. p.285-302. 1994.

HELDT, H.W. Pflanzenbiochemie. Verlag: Heidelberg, 1997.

HEWITT, E. J.; HUCKELESBY, D.P.; NORTON, B.A. Nitrate metabolism. In: BONNER, J.; VARNER, J.E., (Ed.). **Plant Biochemistry**. New York: Academic Press. v.20, p.633-681. 1976.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.J. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: University of California – California Experimental Station. **Circular**. v.347, p.1-39. 1950.

HÖGY, P.; WIESER, H.; KÖHLER, P.; SCHWADORF, K. J.; BREUER, J. J.; FRANZARING, J. R. Effects of elevated CO₂ on grain yield and quality of wheat: Results from a 3-year free-air CO₂ enrichment experiment. **Plant Biology**. v.11, p.60-69. 2009.

IGAMBERDIEV, A.U.; BYKOVA, N.V.; LEA, P. J.; GARDESTROM, P. The role of photorespiration on redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. **Physiol. Plant**. v.111, p.427-438. 2001.

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

KIIHL, R.A.S.; GARCIA, A. The use of the long-juvenile trait in breeding soybean cultivars. In: **WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE**. v.4. p. 994-1000. 1989.

KING, B.J., SIDDIQI, Y., RUTH, T.J., et al. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. **Plant Physiology**, Lancaster, v.102, p.1279- 1286, 1993.

KOHORN, B. D. Inactivation of *Arabidopsis SIP1* leads to reduced levels of sugars and drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p.1215-1219. 2001.

LARCHER, W. A Planta sob Estresse. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, p.341-478, 2004.

LARSSON, C.M., INGEMARSSON, B. Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In: WRAY, J.L., KINGHORN, J.R. Molecular and genetics aspects of nitrate assimilation. **Oxford : Oxford Science**. Chapt.1. p.3-14. 1989.

LAWLOR, D.W. Carbono and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experiment Botany**. v.53, p. 773-787. 2002.

LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja**. p.46. 2010.

LI, D.; LIU, H.; QIÃO, Y.; WANG, Y.; CAI, Z.; DONG, B.; SHI, C.; LIU, Y.; LI X.; LIU, M. Effects of elevated CO₂ on the growth, seed yield, and water use efficiency of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought stress. **Agricultural Water Management**. v.129, p.105-112. 2013.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In: COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. (Ed.): **Methods in Enzymology**, v.148, Academic Press, p.350-382. 1987.

LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; LEAKEY, A.D.B.; NOSBERGER, J.; ORT, D.R. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. **Science**. v. 312, p. 1918-1921. 2006.

LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; ROGERS, A.; ORT, D.R. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future, **Ann. Rev. Plant Biol.** v. 55, p. 591-628. 2004.

LUO, Y.; CURRIE, W.S.; DUKES, J. S.; FINZI, A.; HARTWIG, U.; HUNGATE, B.; McMURTRIE, R.; OREM, R.; PARTON, W.J.; PATAKI, D.E.; SHAW, M.R. Progressive nitrogen limitation of ecosystem response to rising atmospheric carbon dioxide. **BioScience**. v. 54, p. 731-739. 2004.

MACHADO, A.T., MAGALHÃES, J.R., MAGNAVACA, R., et al. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.4, n.1, p.45-47, 1992.

MAGALHÃES, J.R., FERNANDES, M.S. Absorção e metabolismo de nitrogênio sob condições de stress. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS, 1990, Rio de Janeiro, RJ. Anais... Rio de Janeiro : UFRRJ, 1990. p.249-262. 365p.

MACHADO, A.T., MAGALHÃES, J.R. Melhoramento de milho para uso eficiente de nitrogênio sob condições de estresse. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1995, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte : **EMBRAPA/CNPMS**, 449p. p.321-343. 1995.

MAGALHÃES, J.R., MACHADO, A.T. Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM

MAGALHÃES, J.R., MACHADO, A.T, FERNANDES, M.S., et al. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.5, n.2, p.163-166, 1993.

MARCOS FILHO, J.; GODOY, O. P. ; CÂMARA, G. M. S. Tecnologia da produção. In: CÂMARA, G. M. S.; GODOY, O. P.; MARCOS FILHO, J.;

REGITANO d'ARCE, M. A. B. Soja: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo. São Paulo, SP. p. 1-39. 1980.

MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas, SP. Fundação CARGILL. 86 p. 1986.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. **Viçosa**: UFV, v.439. 2005.

MARISCAL, V.; MOULIN, P.; ORSEL, M.; MILLER, A.J; FERNANDEZ, E.; GALVAN, A. Differential Regulation of the *Chlamydomonas Nar1* Gene Family by Carbon and Nitrogen. **Protost**. v.157, p.421-433. 2006.

MARTINOVA, E.; Hock, U.; WIEMKEN, A. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. **Nature**. v.289, p.292-293. 1981.

MATA, L.; CABELLO, P.; HABA, P.; AGUERA, E. Growth under elevated atmospheric CO₂ concentration accelerates leaf senescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Journal of Plant Physiology**. v.169, p.1392-1400. 2012.

MATT, P.; GEIGER, P.; LIU, W.; ENGELS, C.; KRAPP, A.; STITT, M. Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. **Plant, Cell and Environment**. v. 24, p.1119-1137. 2001.

McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, J.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylase in vegetables. **Analytical Chemistry**. v.22, p.1156-1158. 1950.

MIFLIN, B.J.; HABASH, D.Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 979-987. 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Produção de grãos, safra 2013/2014. 2014.

MOGHAIEB, R.E.A.; TANAKA, N.; SANEOKA, H.; MUROOKA, Y.; ONO, H.; MORIKAWA, H.; NAKAMURA, A.; NGUYEN, N.T. R. Suwa, K. Fujita, Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. **Plant Cell and Environment**. v. 29, p.173-182. 2005.

MOORE, B.D.; CHENG, S.H.; SIMS, D.; SEEMANN, J.R. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. **Plant, Cell and Environment**. v. 22, p. 567-582. 1999.

MÜLLER, L. Fisiologia. In: MYIASAKA, S. & MEDINA, J. L. A Soja no Brasil. Campinas, p. 109 - 29. 1981a.

NELSON, C. D.; CLAUSS, H.; NORTIMER, D. C.; GORHAN, P. R. Select translocation of products of photosynthesis on the soybean. **Plant Physiology**, v. 36, n. 35, p. 581-588, 1961.

NIE, G.Y.; LONG, S.P.; GARCIA, R.L.; KIMBALL, B.A.; LAMORTE, FANGMEIER, A.; GRUˆDAS, U.; HERTSTEIN, U.; SANDHAGEHOFMANN, R.L.; PINTER, P.J.; WALL, G.W.; WEBBER, A.N.; ETECTS A.; VERMEHREN, B.; JÄGER, H.J.; Effects of elevated of free-air CO₂ enrichment on the development of the photo- CO₂, nitrogen supply and tropospheric ozone on spring synthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf wheat. 1. Growth and yield. Environ. Pollut. 91, 381–390. Proteins. **Plant Cell Environ.** v.18, p.855-864. 1995.

OAKS, A., HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.345-365, 1985.

ORT, D.R.; OXBOROUGH, K.; WISE, R. R. Depressions of photosynthesis in crops with water deficits, In: BACKER, N. R.; BOWYER, J.R. (Ed). **Phoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field**. Oxford: Bios Scientific Publishers. p.315-329. 1994.

PERSPECTIVA, 1995, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte : **EMBRAPA/CNPMS**. 449p. p 345-367. 1995.

POOTER, H.; PEREZ-SOBA, M. Plant growth at elevated CO₂. **Encyclopedia of Global Environmental Change**. v.2, p.489-496. 2002.

PROVAN, F.; LILLO, C. Photosynthetic post translational activation of nitrate reductase. **Journal of Plant physiology**. v. 154, p. 605-609. 1999.

PURCINO, A.A.C., MAGNAVACA, R., MACHADO, A.T., et al.. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Campinas, v.6, n.1, p.41-46, 1994.

REICH, P.B.; HOBBIIE, S. E.; LEE, T.; ELLSWORTH, D.S.; WEST, J. B.; TILMAN, D.; KNOPS, J.M.H.; NAEEM, S.; TROST, J. Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. **Nature**, v. 440, P. 922-925. 2006.

ROTH, R.; HALL, L.N.; BRUTNELL, T. P. Bundle sheath defective, a mutation that disrupts the coordinated development of bundle sheath and mesophyll cell, in maize leaf. **The Plant Cell**. v.8, p.915-927. 1996.

SAGE, R. F. The evolution of C4 photosynthesis. **New Phytologist** v. 161, p. 341-370. 2004.

SAGE, R.F. *Why C4 photosynthesis?* In: C4 Plant Biology. San Diego: **Academic Press**. p. 616. 1999.

SCHRADER, L.E. Functions and transformations of nitrogen in higher plants. In: HAUCK, R.D. Nitrogen in crop production. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1984. Chapt.2. p.55-65.

SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZ-FONTES, A. LAUERER, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**. v. 9, p. 783–798.1997.

SAGE, R.F. How terrestrial organisms sense, signal, and respond to carbon dioxide, *Integr. Integrative & Comparative Biology*. v.42, p.469-480. 2002.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S.; GOMES, J. L. L. Cultura da Soja; 1ª parte. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 96 p. 1985.

SHARKEY, T. D.; BERNACHI, C. J.; FARQUHAR, G. D.; SINGSAAS, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell & Environment*. v. 30. p. 1035-1040. 2007.

SHIMONO, H.; BUNCE, J.A. Acclimation of nitrogen uptake capacity of rice to elevated atmospheric CO₂ concentration. **Ann Bot**. v.103, p.87-94. 2009.

SNELL, F.D.; SNELL, C.T. Colorimetric methods of analysis. New York: Van Nostrand. p.804-805. 1949.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M. J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p.225-253, 1990.

STO, C. Population the Demography of food. **Hungry for justice**, 73. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**, p.719. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates. p.819. 2008.

TURPIN, D.H., VANLERBERGHE, G.C., AMORY, A.M., et al. The inorganic carbon requirements for nitrogen assimilation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.69, p.1139-1145, 1991.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Production, Supply and Distribution Online. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>.2010.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Agricultural Production. Disponível em:

<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 06 fev 2014.

VAN BEUSICHEM, M.L., KIRKBY, E.A., BAAS, R. Influence of nitrate and ammonium nutrition and the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v.86, p.914-921, 1988.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v.22, p.280-283. 1968.

VAN, O. M.; SCHAPENDONK, A.H.C.M., JANSEN, M.J.H., Pot, Responses to the Gaseous Environment. CHAPMAN and HALL, C.S., VAN KLEEF, J., GOUDRIAAN, J. Effects of elevated London, p.121-145. CO₂ on development and morphology of spring wheat grown HERTSTEIN, U., COLLS, J., EWERT, F., VAN OIJEN, M. Climatic in cooled and non-cooled open-top chambers. **Aust. J. Plant** conditions and concentrations of carbon dioxide and air Physiol. v.25, 617-626. 1998.

VASIL`EV`S,; BRUCE, D. Optimization and evolution of light harvesting in photosynthesis: the role of antenna chlorophyll conserved between photosystem II and photosystem I. **Plant Cell** 16: 3059-3068.2004.

VENCATO, A. Z. Anuário Brasileiro da Soja 2010. Santa Cruz do Sul: Ed. **Gazeta Santa Cruz**. p. 144. 2010.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T. et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **The Plant Journal**. v.3, p.313-324, 1993.

VON CAEMMERER, D.; FURBANK, R.T. The modeling of C₄ photosynthesis. In: Sage RF and Monson RK (eds) C₄.Plant Biology. **Academic Press**. p.173-211.1999.

VON WIRÉN, N., GAZZARRINI, S., FROMMER, W.B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil, The Hague**, v.196, p.191-199, 1997.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**. v. 39, n. 08, p. 971-974. 1967.

WANG, L.; PETERSON,R.B; BRUTNELL, T.P. Regulatory mechanisms underlying C₄ photosynthesis. **New Phytologist**. Tanley Review. 2011.

WEGER, H.G., TURPIN, D.H. Mitochondrial respiration can support NO₃⁻ and NO₂⁻ reduction during photosynthesis. **Plant Physiology**, Lancaster, v.89, p.409-415, 1989.

WINGLER, A., LEA, P. J., QUICK, W.P. e LEEGOOD, R.C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, 355, 1517-1529, 2000.

WOO, K.C., OSMOND, B. Stimulation of ammonia and 2-oxoglutarate-dependent O₂ evolution in isolated chloroplasts by dicarboxylates and the role of the chloroplast in photorespiratory nitrogen recycling. **Plant Physiology**, Lancaster, v.69, p.591-596, 1982.

WOODROW, I. E. AND BERRY, J.A. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants, **Annu. Rev. Plant Physiology Pant Molecular Biology**, v. 39, p. 533-594, 1988.

YAMORI, W; NAGAI, T; MAKINO, A. The rate-limiting step for CO₂ assimilation at different temperatures is influenced by the leaf nitrogen content in several C₃ crop species. **Plant, Cell & Environment**. v.34, p.764-777. 2011.

YANOVA, I. A.; BAYDANOVA, V. D.; VUNKOVA-RADEVA, R. V. Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.495-501. 2000.

YEMM, E. M.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhidrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

ZHOU, Y. M.; WANG, C.G.; S.J; HAN, X.B.; CHENG, M.H.; LI, A.N.; FAN, X.X. Species-specific and needle age-related responses of photosynthesis in two *Pinus species* to long-term exposure to elevated CO₂ concentration. **Trees**. v. 25, p. 163-173. 2011.