



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



TAMARA TORRES TANAN

ABSORÇÃO, ASSIMILAÇÃO E TRANSPORTE DE
NITROGÊNIO EM PLANTAS DE *Physalis angulata* L.

TAMARA TORRES TANAN

**ABSORÇÃO, ASSIMILAÇÃO E TRANSPORTE DE
NITROGÊNIO EM PLANTAS DE *Physalis angulata* L.**

Feira de Santana - BA
2019

TAMARA TORRES TANAN

**ABSORÇÃO, ASSIMILAÇÃO E TRANSPORTE DE
NITROGÊNIO EM PLANTAS DE *Physalis angulata* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Marilza Neves do Nascimento

Feira de Santana - BA
2019

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

T166a Tanan, Tamara Torres
Absorção, assimilação e transporte de nitrogênio em plantas de
Physalis angulata L. / Tamara Torres Tanan . – 2019.
130 f.: il.

Orientadora: Marilza Neves do Nascimento

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2019.

1.Frutificação. 2.Redutase do nitrato. 3.Crescimento. 4.*Physalis*
angulata. I.Nascimento, Marilza Neves do, orient. II.Universidade
Estadual de Feira de Santana. III.Título.

CDU: 581.1

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Daniela Deitos Fries

Prof^a. Dr^a. Marília Mércia Lima Carvalho Carneiro

Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Marilza Neves do Nascimento
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA
2019

A minha mãe, Fabíola, pelo apoio constante e
amor incondicional.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Feira de Santana por ter propiciado a minha formação acadêmica e ter sido a minha segunda casa ao longo desses dez anos.

A CAPES pela bolsa concedida e pelo financiamento da pesquisa. Esse estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos os docentes do PPGRGV pelos ensinamentos que foram fundamentais para meu aperfeiçoamento profissional.

A minha família que é a minha base, sem eles nada seria. A minha mãe, Fabíola, que sempre foi a minha grande inspiração e pela qual me esforço a cada dia para ser uma pessoa melhor e ser o seu motivo de orgulho. Te amo, mãe! Ao meu pai, Marivaldo, que sempre acreditou em mim, até mais do que eu mesma, e sempre apoiou as minhas escolhas. Aos meus irmãos, Nanda, Igor e Lucca, eu os amo demais e me orgulho muito de tê-los como irmãos. A minha princesa, Lua, que é minha motivação e a alegria dos meus dias.

Ao meu companheiro, Pedro, que sempre me apoiou e acreditou em mim, me incentivando a cada momento de fraqueza ou tristeza. Obrigada por tudo!

A minha orientadora Dr. Marilza Neves do Nascimento, por sempre acreditar no meu potencial. Foram oito anos de convivência e aprendizado, tenho muito orgulho de ser sua orientanda desde a graduação e espero um dia ser pelo menos um pouco da profissional que você é.

A Dr. Claudineia Pelacani, por todos os ensinamentos e sábios conselhos.

Ao meu estagiário que virou amigo, Alismário Leite (Marinho), pessoa fundamental para a realização desse projeto, sem ele nada disso seria possível. Não há palavras para expressar o quanto sou agradecida!

A Uasley Caldas por toda a dedicação com o meu trabalho, mesmo estando tão ocupado com os seus afazeres. Serei eternamente grata!

A todos os meus colegas de LAGER, que sempre fizeram do laboratório um ambiente de trabalho divertido, em especial a Romeu e David que estão comigo na caminhada há muitos anos.

Aos colegas de RGV que me acompanharam nessa jornada, sempre compartilhando as dificuldades e as vitórias, em especial a Keylla, Tecla e Flávia que se tornaram grandes amigas.

A toda a equipe do Horto Florestal pelo acolhimento e ajuda, a Sr. Marcos por sempre ser prestativo comigo, a D. Cláudia e D. Sandra pelas conversas divertidas na copa, e a todos os meninos de campo pelo suporte essencial aos nossos trabalhos.

A Deus, por me permitir chegar até aqui, pelas dificuldades e pelas vitórias concedidas.

9Esse é o encerramento de uma longa etapa que deixará muita saudade, e por isso sou grata a todos que convivi e que me ajudaram a tornar esse sonho possível.

Muito Obrigada!

"O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a ilusão do conhecimento."

Stephen Hawking

RESUMO

TANAN, T. T. 2019. **Absorção, assimilação e transporte de nitrogênio em plantas de *Physalis angulata* L.** 128 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, 2019.

O Brasil se destaca pela sua biodiversidade vegetal, entretanto, diversas espécies são subutilizadas apesar do grande potencial. É o caso da *Physalis angulata* L., espécie que tem as suas atividades biológicas extensivamente investigadas, porém, poucas informações sobre o seu cultivo e aspectos fisiológicos. Esse trabalho objetivou descrever a influência do uso de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento, metabolismo e qualidade de frutos em plantas de *P. angulata*, além de adequar protocolos para quantificação de clorofila e da atividade da enzima redutase do nitrato (RN). Para a extração de clorofila foi avaliado o uso da acetona 80%, etanol 95% e dimetilsulfóxido. Entre esses, a técnica tradicional de maceração do tecido vegetal com acetona 80% foi mais eficiente. Contudo, pela facilidade de obtenção, manuseio e menor custo desse solvente, sugere-se a utilização do etanol 95%. A redução do nitrato ocorre tanto em raiz como em folhas, com maior atividade nos períodos de maior radiação solar e temperatura. A partir de variações nas condições do método *in vivo* para quantificação da atividade da RN, recomenda-se para a *P. angulata*, o uso de n-propanol 1%, adição de 50 mM de KNO_3^- , em tampão fosfato pH 7, incubado em banho-maria por 75min para determinação da máxima atividade. Para a análise do efeito de diferentes fontes nitrogenadas utilizou-se 5 proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100) na solução nutritiva hidropônica. Em altos níveis, o amônio reduziu o comprimento do caule e da raiz, o número de ramificações, a expansão foliar e o teor de clorofila, além de retardar a floração e frutificação e alterar o sítio principal de atividade da RN. Entretanto, a aplicação de NO_3^- em conjunto com o NH_4^+ aliviou os sintomas de toxidez, sendo as proporções de 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ que proporcionaram melhor desenvolvimento e crescimento. O uso da dose de 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ é aconselhável pois produz frutos maiores, mais doces e com sementes vigorosas. O metabolismo do C foi afetado pelas formas de N utilizadas, com redução na condutância estomática, transpiração, e acúmulo de açúcares e aminoácidos quando supridas com NH_4^+ . A disponibilidade de ambas as formas iônicas promove maior concentração de N-total, eleva ao equilíbrio de cargas, evitando a redução de outros cátions e ânions.

Palavras-chaves: nitrato, amônio, redutase do nitrato, clorofila, crescimento, frutificação.

ABSTRACT

TANAN, T. T. 2019. **Nitrogen absorption, assimilation and transport in plants of *Physalis angulate* L.** 128 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, 2019.

Brazil stands out for its vegetal biodiversity; however, several species are underutilized despite great potential, this is the case of *Physalis angulata* L. The biological activity of this species is extensively investigated; but little information is available on its cultivation and physiological aspects. The aim of this study was to describe the influence of the use of different nitrogen sources on growth, metabolism and fruit quality in *P. angulata* plants, as well as to adapt protocols for quantification of chlorophyll and nitrate reductase enzyme activity (RN) in plant tissue of the species. We evaluated the use of 80% acetone, 95% ethanol and dimethyl sulfoxide for the extraction of chlorophyll. Of these, the traditional technique of maceration of the vegetal tissue with 80% acetone was more efficient, however, because it does not differ and because of the ease of obtaining, handling and lower cost of this solvent, we suggest the use of 95% ethanol. The reduction of nitrate occurs in both root and leaves, with higher activity during periods of higher solar radiation and temperature. Based on variations in the conditions of the in vivo method for quantification of NR activity, we recommend for *P. angulata* the use of 1% n-propanol and 50 mM KNO_3^- addition in the incubation medium with pH 7 of phosphate buffer, which must be incubated in a water bath for 75 minutes to determine maximum activity. For the analysis of the effect of different nitrogen sources, we used five proportions of NO_3^- : NH_4^+ (100: 0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0: 100) in the hydroponic nutrient solution. The ammonium levels reduced stem and root length, number of branches, leaf expansion, and chlorophyll content, as well as delaying flowering and fruiting, and altering the main site of NR activity. However, the application of NO_3^- and NH_4^+ together alleviated toxicity symptoms, with the ratios of 75:25 and 50:50 NO_3^- : NH_4^+ giving better development and growth. The use of 50:50 of NO_3^- : NH_4^+ is advisable because it produces larger fruits, more sweet and with vigorous seeds. The N-form used affected the metabolism of carbon, with reduction in stomatal conductance, transpiration, and accumulation of sugars and amino acids when supplied with NH_4^+ . The availability of both ionic forms promotes higher concentration of N-total, and leads to the equilibrium of charges, avoiding the reduction of other cations and anions.

Keywords: nitrate, ammonium, nitrate reductase, chlorophyll, growth, fruiting.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor médio de pigmentos fotossintéticos extraídos de folhas de *Physalis angulata* por diferentes solventes e metodologias.

Tabela 2. Resultados da análise de variância para as variáveis de crescimento avaliadas ao longo do desenvolvimento das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em sistema hidropônico sob diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para a clorofila total (CHL) e atividade da redutase do nitrato (aRN) avaliadas ao longo do desenvolvimento das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em sistema hidropônico sob diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Tabela 4. Coloração dos frutos de *Physalis angulata* coletados de plantas cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio.

Tabela 5. Porcentagem de germinação (G), tempo médio (TMG) e velocidade média (V) da germinação de sementes dos frutos de *Physalis angulata* oriundos de cultivos com diferentes fontes de nitrogênio.

Tabela 6. Composição das soluções nutritivas utilizadas no experimento.

Tabela 7. Efeito da nutrição com diferentes proporções de nitrato e amônio na concentração de CO₂ subestomática (Ci), condutância estomática (Gs), assimilação de CO₂ (A), taxa de transpiração (E) e teor de clorofila total (Chl) em plantas de *Physalis angulata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de *Physalis angulata*: ramo com flores (A) e fruto (B).

Figura 2. Teor de clorofila *a*, *b* e total (*a* + *b*) nas folhas de *Physalis angulata* extraídas a partir de diferentes solventes. A – Acetona, B – DMSO, C – Etanol.

Figura 3. Variação diurna da atividade da Redutase do Nitrato em tecidos foliares e radiculares de *Physalis angulata* L.

Figura 4. Dados meteorológicos obtidos na Estação Climatológica da Universidade Estadual de Feira de Santana, BA. Valores médios dos dias avaliados (A – pluviosidade e temperatura máxima e mínima; B – Radiação solar e umidade do ar máxima e mínima).

Figura 5. Otimização do método para quantificação da Redutase do Nitrato (RN). A - atividade da RN em diferentes períodos de incubação; B – atividade da RN em diferentes concentrações de n-propanol; C – atividade da RN em diferentes concentrações de nitrato; D – atividade da RN em diferentes pH.

Figura 6. Fotografia das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas sob cinco proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Figura 7. Comprimento da haste principal (A), diâmetro do caule (B), comprimento da raiz (C) e número de ramificações (D) de plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em sistema hidropônico sob diferentes doses de nitrato e amônio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$)

Figura 8. Largura (A), comprimento (B) e área (C) do primeiro par de folhas das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$)

Figura 9. Crescimento vegetativo, ocorrência de botões florais, flores abertas e início da frutificação em plantas de *Physalis angulata* L. submetidas a diferentes concentrações de nitrato e amônio na solução nutritiva. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$).

Figura 10. Teor de clorofila das folhas de *Physalis angulata* L. quando submetidas a proporções de nitrato e/ou amônio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$).

Figura 11. Atividade da Redutase do Nitrato foliar (A) e radicular (B) da *Physalis angulata* L. ao longo do desenvolvimento cultivadas com doses de nitrato e/ou amônio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$).

Figura 12. Características físicas dos frutos de *Physalis angulata* coletados de plantas cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas. A – peso do fruto (PF); B – diâmetro transversal (DT); C – diâmetro longitudinal (DL); D – Relação DL/DT; E - peso de sementes por frutos (PSF).

Figura 13. Caracterização química dos frutos de *Physalis angulata* coletados de plantas cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio. A – Sólidos solúveis totais (SST); B - Acidez total titulável (ATT); C - Relação STT/ATT.

Figura 14. Frequência relativa de germinação de sementes de *Physalis angulata* coletadas de frutos oriundos de cultivos em diferentes proporções de nitrato e amônio.

Figura 15. Teor de açúcares solúveis totais e açúcares redutores em folhas e raízes de *Physalis angulata* cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio.

Figura 16. Teor de aminoácidos totais livres e proteínas totais em folhas e raízes de plantas de *Physalis angulata* cultivadas com diferentes proporções de nitrato e amônio.

Figura 17. Teor de N-nítrico e N-amoniacoal em folhas e raízes de plantas de *Physalis angulata* cultivadas em solução nutritiva com variadas concentrações de nitrato e amônio.

Figura 18. Teor de potássio, nitrogênio e fósforo em folhas e raízes de plantas de *Physalis angulata* cultivadas sob diferentes proporções de nitrato e amônio.

Figura 19. Atividade da redutase do nitrato (aRN) em tecidos foliares e radiculares de *Physalis angulata* cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 O gênero <i>Physalis</i> - <i>Physalis angulata</i> L.....	19
2.2 O nitrogênio na nutrição mineral.....	21
2.3 Metabolismo do Nitrogênio	23
2.3.1 Redutase do Nitrato.....	25
2.4 Metabolismo do Nitrogênio e Fotossíntese.....	25
Referências.....	28
CAPÍTULO 1 - DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM FOLHAS DE <i>Physalis angulata</i> L. UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGIAS	
Introdução	39
Material e Métodos.....	41
Resultados e Discussão.....	42
Conclusões	45
Referências.....	45
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO (RN) EM TECIDOS FOLIAR E RADICULAR DE <i>Physalis angulata</i> L.: VARIAÇÕES DIURNAS E OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO	
Introdução	51
Material e Métodos.....	53
Resultados e Discussão.....	55
Conclusão.....	59
Referências.....	60
CAPÍTULO 3 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE <i>Physalis angulata</i> L. SOB DIFERENTES PROPORÇÕES E FONTES DE NITROGÊNIO	
Introdução	66
Material e Métodos.....	67
Resultados	70
Discussão	77

Conclusão.....	82
Referências.....	82
CAPÍTULO 4 - EFEITO DE FONTES NITROGENADAS NAS CARACTERÍSTICAS DOS FRUTOS E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE <i>Physalis angulata</i> L.	
Introdução	90
Material e Métodos.....	91
Resultados e Discussão.....	93
Conclusões	100
Referências.....	100
CAPÍTULO 5 - EFEITOS DOS ÍONS NITRATO E AMÔNIO NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO E DO CARBONO EM PLANTAS DE <i>Physalis angulata</i> L.	
Introdução	107
Material e Métodos.....	108
Resultados	111
Discussão	118
Conclusão.....	123
Referências.....	124
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	131

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país que se destaca pela sua biodiversidade, incluindo espécies vegetais com amplo potencial econômico e farmacológico. Apesar de muitas espécies nativas serem exploradas, muito da flora brasileira permanece subutilizada. Esse é o caso da *Physalis angulata* L., espécie de grande potencial medicinal, devido à sua composição fitoquímica, e com potencial para a fruticultura, por apresentar frutos de alto valor nutracêutico. O gênero *Physalis*, pertencente à família Solanaceae, apresenta cerca de 120 espécies, amplamente distribuídas no mundo (LI et al., 2008), com prováveis origens no Continente Americano (HUNZIKER, 2001). As espécies do gênero se destacam e são alvos de diversos estudos fitoquímicos e de atividade biológica, devido a produção de vitaesteróides, como as fisalinas (TOMASSINI et al., 2000).

Diversas espécies vegetais são utilizadas na medicina popular, porém poucas são aquelas com múltiplas potencialidades, como alimentícias e produtoras de compostos secundários de interesse, como a *Physalis*. As espécies nativas com diversos potenciais têm despertado interesse de empresas cosmética, farmacêuticas e alimentícias, entretanto, há uma grande dificuldade na sua utilização pois faltam pesquisas na cadeia produtiva que deem segurança no uso. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias de cultivo e de exploração apropriadas, com destaque àquelas relacionadas a nutrição mineral, em especial ao metabolismo do nitrogênio (N), nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas.

Apesar do N_2 ser o gás presente em maior quantidade na atmosfera, somente algumas plantas conseguem obtê-lo, por meio da associação com microrganismos fixadores de nitrogênio. Deste modo, o N existente na solução do solo é o disponível para grande parte das plantas, podendo ser absorvido na forma de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). O amônio quando absorvido já está prontamente disponível para assimilação pelas enzimas do metabolismo do N, enquanto o nitrato precisa ser reduzido a nitrito e posteriormente a amônio pelas enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito, respectivamente. A redução do NO_3^- tem um maior custo energético, apesar disso, a maioria das plantas absorvem preferencialmente o N na forma nítrica, já que o amônio pode ser tóxico a planta. A preferência pela forma nitrogenada absorvida pode ser observada entre espécies relacionadas, assim como, também é influenciada por fatores externos como a acidez do solo.

O metabolismo do N compreende os processos de absorção, assimilação e transporte, que depende de diversos fatores como a disponibilidade de N no solo, localização e regulação das enzimas envolvidas e a energia oriunda dos processos fotossintéticos. Apesar do

metabolismo do N ser bem estudado em algumas espécies de importância econômica, para o gênero *Physalis* as informações ainda são insuficientes. A maior parte dos estudos existentes avaliaram os efeitos da concentração de fertilizantes nitrogenados no crescimento e produtividade da planta (THOMÉ; OSAKI, 2010; BERTONCELLI et al., 2017; LEITE et al., 2017), outros trabalhos verificaram a influência do uso de nitrato e amônio no crescimento de *Physalis peruviana* (CASTAÑEDA-SALINAS et al., 2013; ANTÚNEZ-OCAMPO et al., 2014), entretanto, os aspectos fisiológicos do metabolismo do N não foram abordados, como a ação das enzimas, a relação com o metabolismo do carbono, entre outros.

Devido à escassez de informações para o gênero, em especial a *P. angulata*, esse trabalho tem como objetivo ampliar o conhecimento acerca do metabolismo do nitrogênio em plantas da espécie. Para tal, dividiu-se o estudo em cinco seções: a primeira visou a avaliação de diferentes protocolos de extração de clorofila; a segunda, a análise da variação diurna e otimização do protocolo *in vivo* para quantificação da atividade da redutase do nitrato; a terceira, a compreensão das respostas fisiológicas de crescimento em função do cultivo com diferentes fontes nitrogenadas; a quarta, a caracterização dos frutos e a germinação de sementes de plantas cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas; e a quinta, a avaliação dos efeitos dos íons nitrato e amônio no metabolismo do carbono e do nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Physalis* - *Physalis angulata* L.

O gênero *Physalis* pertence à família Solanaceae, uma das maiores famílias entre as angiospermas, com cerca de noventa espécies representantes. O México é tido como o centro de diversidade deste gênero que é facilmente reconhecido devido à sua morfologia peculiar, que tem como característica o cálice da flor que cresce envolvendo e protegendo o fruto. Com exceção de *Physalis alkekengi* L., que é euroasiático, todos os demais representantes são americanos (HUNZIKER, 2001). No Brasil, é relatada a ocorrência de nove espécies com distribuição em todas as regiões do país (STEHMANN et al., 2015).

Dentre as espécies, *Physalis angulata* L. destaca-se por seu potencial medicinal. Conhecida popularmente como camapú, juá-de-capote e saco-de-bode, é nativa da região amazônica e apresenta comportamento ruderal (KISSMANN; GROTH, 2000), sendo comumente observada formando grandes populações em solos revolvidos de lavouras no período que antecede o plantio (RUFATO et al., 2013). A espécie possui distribuição Neotropical ocorrendo na América do Norte, Central, do Sul e Caribe (LORENZI; MATOS, 2008). No Brasil, já foi relatada a ocorrência em todos os estados exceto Roraima, Sergipe e Tocantins (STEHMANN et al., 2015).

A *P. angulata* é uma planta herbácea e ereta que pode atingir de 40-70 cm de altura, morfologicamente apresenta folhas alternas, pubescentes e tricomas simples glandulares (Figura 1A). A lâmina foliar é anfiestomática, com estômatos anisocítico e esporadicamente anomocítico em ambas as faces, ocorrendo em maior número na face abaxial, o mesófilo é heterogêneo e dorsiventral. As flores são solitárias ou em cimeiras, axilares, pentâmeras, com corola campanulada de coloração amarelo pálida e base interior marrom, e anteras azuis. O fruto consiste em uma baga globosa, de 1,0 a 1,5 cm de diâmetro, envolvida pelo cálice acrescente e inflado, em forma de balão, com numerosas sementes discóides, de testa reticulada e coloração de ferrugíneo a marrom (Figura 1B) (SILVA et al., 2005).

Os frutos são de cor amarelo, quando maduros, e apresentam potencial para serem explorados comercialmente. De sabor doce e levemente ácido, os frutos maduros têm bom conteúdo de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, alto conteúdo de vitamina C (75 mg.100 g⁻¹) e contém cerca de 11 °Brix de sólidos solúveis, sendo a maior porcentagem de açúcares constituída por sacarose (CURI et al., 2017).



Figura 1. Plantas de *Physalis angulata*: ramo com flores (A) e fruto (B). FONTE: SOUZA, 2009

Dentre as espécies, a *P. angulata* é, sem dúvida, a mais representativa do gênero, considerando o seu valor medicinal. É alvo de diversos estudos químicos e farmacológicos, sendo largamente empregada na medicina popular de vários países. Seu potencial medicinal é atribuído a sua composição fitoquímica, na qual encontram-se flavonoides, alcaloides e diferentes esteroides, dentro desse grupo destacam-se as fisalinas, que apresentam diversas propriedades farmacológicas, como atividade antiparasítica, antiviral e antineoplásica (MARIN SISLEY et al., 2017; TOMASSINI et al., 2000). Diversos estudos demonstram as propriedades terapêuticas da planta com possibilidade para ser utilizada como matéria-prima na indústria farmacêutica ou em programa de fitoterapia (AMARAL et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2010; PINTO et al., 2010; SUN et al., 2016).

Assim como grande parte das plantas medicinais, muitas espécies do gênero *Physalis* são obtidas através da coleta no seu habitat natural, não sendo suficientes para atender uma demanda crescente, principalmente, quando a espécie possui características multiusos (ALAMINO, 2011), e comprometendo a sobrevivência da espécie no ambiente. Trabalhos recentes tratam acerca do cultivo da *P. angulata* (CRUZ et al., 2015; VARGAS-PONCE et al., 2016; ABREU et al., 2017; LEITE et al., 2017; MEZZALIRA et al., 2017; TANAN et al., 2018), entretanto, ainda há diversas lacunas sobre o seu cultivo e suas respostas fisiológicas a diferentes condições, fatores que quando conhecidos contribuem para melhorar a qualidade, aparência da planta e produtividade.

2.2 O nitrogênio na nutrição mineral

A alta produção agrícola depende fortemente da fertilização com elementos minerais. No entanto, as plantas cultivadas, tipicamente, utilizam menos da metade dos fertilizantes aplicados e o restante pode ser lixiviado para os lençóis subterrâneos de água, tornar-se fixado ao solo ou contribuir para a poluição do ar (LACERDA et al., 2007). Assim, é de grande importância aumentar a eficiência de absorção e de utilização de nutrientes, buscando reduzir os custos de produção e contribuir para evitar prejuízos ao meio ambiente.

Dentre os nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas destaca-se o nitrogênio (N), um dos nutrientes mais absorvidos, com efeito direto na distribuição de fotoassimilados entre a parte vegetativa e reprodutiva, promovendo modificações na fisiologia e morfologia da planta, estando relacionada com a fotossíntese, ampliação do sistema radicular, absorção iônica de nutrientes e desenvolvimento celular (QUEIROGA et al., 2007); e presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADH, NADPH, DNA, RNA, clorofila e proteínas (MIFLIN; LEA, 1976; HARPER, 1994).

O excesso ou deficiência deste nutriente é prejudicial à planta, afetando seu crescimento e produção, podendo resultar em perdas significativas (ALVARENGA, 2004). Quando o suprimento de nitrogênio não é adequado, o crescimento é retardado e esse é mobilizado das folhas mais velhas para as áreas de novo crescimento. O sintoma típico de deficiência de N é a senescência precoce das folhas com clorose característica (BATISTA et al., 2003). Ocorrem também mudanças na morfologia da planta, redução na relação parte aérea/raízes, no comprimento, largura e espessura das folhas (KERBAUY, 2004). A demanda de nitrogênio pelas plantas varia com a espécie, e o teor de nitrogênio também varia com a parte da planta

analisada. A dose de nitrogênio ideal para o cultivo de diversas espécies de importância econômica vem sendo extensamente avaliadas. Para *P. angulata*, Leite et al. (2017) determinaram a dose econômica de 162 mg.L⁻¹ de N, que acarretou em maior produtividade.

Em ecossistemas naturais, as fontes de nitrogênio são a atmosfera e a matéria orgânica presente no solo. Na atmosfera, embora o nitrogênio molecular (N₂) contribua com 78%, sua abundância não é refletida em disponibilidade para as plantas devido à sua grande estabilidade química, entretanto, algumas plantas conseguem estabelecer uma associação simbiótica com bactérias fixadoras de N₂ (TAIZ; ZEIGER, 2017) e, essa associação, é capaz de fornecer mais de 90% do nitrogênio necessário para o desenvolvimento vegetal (VALARINI; GODOY, 1994). No solo, o nitrogênio oriundo tanto da fixação do N₂ quanto da decomposição da matéria orgânica sofre mineralização mediada por microorganismos, produzindo amônio (NH₄⁺) e/ou nitrato (NO₃⁻), sendo estas, as principais formas de nitrogênio utilizadas pelas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Em solos, a forma nítrica é mais abundante devido à ação de bactérias que promovem a oxidação do amônio, processo chamado de nitrificação, entretanto, em condições de acidez do solo, a ação desses microorganismos é inibida (KLOTZ; STEIN, 2008). O amônio, por possuir carga elétrica líquida positiva, é retido no solo, enquanto que o nitrato é facilmente lixiviado. Deste modo, ambas as formas nitrogenadas podem estar disponíveis no solo e serem absorvidas pelas plantas em taxas e proporções que variam de acordo com os fatores genéticos e ambientais (WARD et al., 2007).

A maioria das plantas absorvem preferencialmente o N na forma nítrica, apesar do maior custo energético para a sua absorção e redução, pois o amônio em elevadas concentrações poder causar toxicidade (BRITTO; KRONZUCKER, 2002). O nível de tolerância ao amônio varia entre plantas. Em espécies que se desenvolvem em solos ácidos, o NH₄⁺ é preferencialmente absorvido, enquanto espécies de solos alcalinos ou calcários tem a preferência pelo NO₃⁻ (BARTELHEIMER; POSCHLOD, 2014). Semelhanças no nível de tolerância ao amônio podem ser observadas em espécies relacionadas. As plantas da família Solanaceae são classificadas por Britto e Kronzucker (2002) como sensíveis ao amônio, com predomínio dos estudos em plantas de tomate (PARRA-TERRAZA et al., 2010; LIU et al. 2017; BARRETO et al. 2018). Para o gênero *Physalis* os trabalhos são escassos, limitando-se ao estudo de Castañeda-Salinas et al. (2013), no qual relataram que a forma nítrica é a preferencialmente absorvida em *P. peruviana*.

2.3 Metabolismo do Nitrogênio

O metabolismo do nitrogênio compreende os processos de absorção, redução, assimilação e mobilização do nitrato e ou amônio. As plantas têm desenvolvido mecanismos para máxima eficiência de utilização do nitrogênio, em que se inclui um sistema complexo de vias metabólicas altamente reguladas que se alternam em função do armazenamento, da remobilização, da assimilação ‘de novo’, da reciclagem durante a fotorrespiração e da distribuição entre as vias primárias e secundárias do metabolismo. Em todos esses processos existe uma estreita sincronia entre os controles transcricional e pós-transcricional, para permitir que a planta equilibre suas relações de carbono e nitrogênio (STITT; KRAPP, 2002).

As plantas geralmente mostram diferentes respostas em sua fisiologia e crescimento às fontes de N utilizadas. A absorção do nitrato ocorre pelo processo ativo em sistema simporte, contra um potencial eletroquímico, com transporte simultâneo de H^+ e NO_3^- para dentro das células numa relação de 2:1, sendo o custo energético para esta absorção de 2 moles de ATP para cada mol de NO_3^- absorvido (TAIZ; ZEIGER, 2017). Quanto à absorção do amônio, ocorre por via de sistema uniporte, por um processo passivo e, ao contrário do nitrato, o amônio está prontamente disponível para incorporação sem necessidade de gastos energéticos.

Após a absorção pela planta, o nitrogênio inorgânico é incorporado em moléculas orgânica pelos processos assimilatórios. Os processos de absorção e assimilação são altamente sincronizados embora, sob concentrações elevadas, a absorção do amônio e do nitrato possa exceder a capacidade da planta em assimilar esses íons (FORDE, 2000). Contudo, com relação ao nitrato, o equilíbrio entre esses processos pode ser mais bem estabelecido, pois altos níveis absorvidos podem ser acumulados no vacúolo ou podem ser translocados através dos tecidos sem efeitos prejudiciais. Tratando-se do amônio, altos níveis nos tecidos, podem gerar toxidez (BRITO; KRONZUCKER, 2001).

A assimilação do nitrato, comparada ao amônio, demanda mais energia, requerendo a transferência de 8 moles de elétrons e 2 moles de ATP por mol de nitrato convertido em glutamato (WEGER; TURPIN, 1989). Apesar da alta demanda energética para a utilização do nitrato, o crescimento da maioria das plantas é melhor quando supridas com este íon e não com amônio (BRITO; KRONZUCKER, 2002). Essa aparente contradição tem determinado o aprofundamento das pesquisas visando identificar os motivos pelos quais as plantas cultivadas, em sua maioria, têm o crescimento reduzido quando na solução do solo existe apenas o íon amônio. Uma possibilidade é que a necessidade de desintoxicação da planta, em função do

excesso de amônio absorvido, pode anular essa vantagem em termos de custo energético (GUO et al., 2002).

A redução do nitrato é feita por meio da sua conversão a nitrito pela ação da enzima redutase do nitrato (RN), a primeira e mais importante enzima deste processo. Sua atividade depende, principalmente, da luz e do contínuo suprimento de nitrato, através do xilema (KAWACHI et al., 2002). O nitrito produzido é, posteriormente, reduzido a amônio pela enzima redutase do nitrito (RNi) plastídica ou cloroplastídica. O amônio absorvido ou produzido pela assimilação do nitrato, ou ainda oriundo da fotorrespiração, é incorporado em compostos orgânicos, glutamina e glutamato, pelas enzimas de assimilação do amônio, Glutamina sintetase (GS) e Glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT). Estes compostos translocam nitrogênio orgânico entre os tecidos fontes e dreno e geram, pela ação das transaminases, todos os compostos nitrogenados. Outra importante enzima é a glutamato desidrogenase (GDH) que devido à reversibilidade da reação que catalisa, atua na aminação ou desaminação do glutamato dependendo do estado fisiológico da planta (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os sítios de assimilação do nitrogênio variam de acordo com a concentração de nitrogênio exógeno e com a localização das enzimas do metabolismo. De forma geral, em concentrações baixas de nitrato e ou amônio a redução dos compostos ocorre preferencialmente nas raízes. Em altas concentrações de nitrato o armazenamento e o transporte para as partes aéreas são preferenciais, em virtude da maior disponibilidade de poder redutor, energia e de fotoassimilados (SECHLEY et al., 1992; AGRELL et al., 1997). Ao contrário, o amônio por ser tóxico é prontamente assimilado nas raízes. Contudo, quando a assimilação é na raiz, há uma forte dependência de importação de fotoassimilados produzidos nas folhas para gerar energia e fornecer esqueletos de carbono para o processo de incorporação do nitrogênio (OAKS, 1992).

Várias pesquisas têm sido conduzidas para elucidar a contribuição quantitativa de cada enzima de assimilação durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas (MIFLIN; HABASH, 2002; TCHERKEZ; HODGES, 2008), porém, a existência de múltiplas isoenzimas, distribuídas em diferentes compartimentos celulares e órgãos, têm gerado resultados divergentes, o que dificulta a compreensão dos processos assimilatórios (ISHIYAMA et al., 2004).

2.3.1 Redutase do Nitrato

A Redutase do Nitrato (RN) é uma flavoproteína formada por duas subunidades idênticas, com três grupos: FAD, heme e um complexo constituído de molibdênio e pterina (MoCo). A redutase do nitrato representa uma curta cadeia de transporte de elétrons localizada no citosol, onde a redução do nitrato tem início com a transferência de elétrons do NAD(P)H para o cofator FAD, que os transfere para o citocromo *b5*, no grupo heme, e depois para o MoCo, no qual o nitrato será reduzido a nitrito (CAMPBELL, 1999; FISCHER et al., 2005). Esse é considerado o passo limitante e principal na absorção de nitrogênio pelas plantas (LILLO et al., 2003).

A redutase do nitrato possui vários mecanismos de regulação, os quais são necessários para evitar o acúmulo de nitrito, considerado tóxico. As principais formas de controle estão em nível transcricional e pós-traducional. O primeiro ocorre em longo prazo e pode ser induzido pelo nitrato como sinal primário, ou pela luz, citocininas, sacarose e CO₂. O pós-traducional é rápido, ocorre em minutos, sendo essencial na adaptação do metabolismo para mudanças diárias de luz/escuro e variações da intensidade luminosa (MATSUMURA, 2012).

A atividade da redutase do nitrato varia durante o dia e apresenta baixa atividade no escuro. Em condições normais de ativação e na presença de luz a sua ação é em média 70 a 90%, reduzindo para 10 a 30% no escuro (KAISER; HUBER, 2001). A luz está envolvida na indução dessa enzima de forma direta, mediada pelo fitocromo, ou indireta, através da ativação da fotossíntese e produção de açúcares (RAJASEKHAR, 1998; LILLO et al., 2004). Roth et al (1996) avaliando um mutante de milho deficiente em ribulose bifsosfato carboxilase, verificaram menor atividade da redutase do nitrato na presença de luz e também no escuro, dando suporte à hipótese de que a ativação dessa enzima na presença de luz depende dos produtos do ciclo de Calvin.

2.4 Metabolismo do nitrogênio e Fotossíntese

A alta relação entre a fotossíntese e o nitrogênio nas folhas é amplamente conhecida, e pode ser compreendida pelo papel dos produtos advindos da rota fotossintética no metabolismo do nitrogênio, tanto pela influência do conteúdo de nitrogênio nas proteínas do ciclo de Calvin e dos tilacóides. A absorção e a assimilação do nitrogênio são altamente dependentes dos intermediários do ciclo fotossintético. Os níveis de carboidratos alteram a forma de expressão das principais enzimas de assimilação do N, e quando em altas concentrações, os carboidratos estimulam a proteína fosfatase, que desfosforila um resíduo de serina chave na região do hinge

1 da redutase do nitrato, ativando a enzima. Ademais, a ação da redutase do nitrito e da GOGAT de tecidos clorofilados é dependente da ferredoxina derivada do transporte de elétrons da fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Por outro lado, 50 a 70% do nitrogênio absorvido e translocado para as folhas são integrantes de enzimas cloroplastídicas (CHAPMAN; BARRETO, 1997). A influência do nitrogênio na fotossíntese pode ser dividida em duas partes, a primeira relacionada à proteína solúvel ribulose 1-5 bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), e a segunda com relação aos complexos pigmentos-proteínas nos tilacóides, relacionando-se com a fase bioquímica e fotoquímica, respectivamente (EVANS, 1989). A Rubisco representa um pool de N na folha, com 15% a 30% do teor de N-total foliar localizado nessa enzima (MAKINO, 2003). Warren et al. (2003) demonstraram que o aumento do conteúdo de N, aumenta o teor de Rubisco, e essa funciona cada vez mais como uma proteína de armazenamento, indo além de suas funções catalíticas.

A maior parte do N dos tilacóides está presente nas clorofilas. A relação entre o teor de clorofila para uma dada quantidade de nitrogênio foliar varia, dependendo da irradiância e da temperatura, indicando que a quantidade de clorofila é um fator dinâmico e que responde à variação de alguns componentes do ambiente (MAE, 1997). Carvalho et al. (2003) observaram que, à medida que aumenta o conteúdo de N nas folhas, o teor de clorofila aumenta proporcionalmente em feijoeiro, fato observado também por outros autores, como Reis et al. (2006) para o cafeeiro e Ferreira et al. (2006) para o tomateiro. Devido a essa correlação existente, o uso da quantificação da clorofila como estimativa do teor de N vem sendo utilizada, podendo ser uma determinação mais sensível, rápida e barata às variações do suprimento de N que as determinações do elemento na matéria seca das folhas, o que possibilitaria maior rapidez na detecção da deficiência de N em cultivos (SOUZA et al., 2011).

A forma nitrogenada preferencialmente absorvida pela planta também tem grande relação com o metabolismo do carbono. Altas concentrações de NH_4^+ podem levar ao seu acúmulo na folha e acarretar no decréscimo da fotossíntese (BLACKWELL et al., 1987), como relatado por Guo et al. (2011) em *Catharanthus roseus*. Isso pode estar associada a redução na condutância estomática (LU et al., 2005) e, conseqüentemente, diminuição das trocas gasosas (GUO et al., 2011), ou à redução da velocidade de carboxilação da Rubisco e da taxa de transporte de elétrons quando o NH_4^+ é fornecido, em comparação ao NO_3^- (CARNEIRO et al., 2015). Além disso, em altas concentrações de amônio, a demanda por fotoassimilados na raiz

da planta é alta, para a rápida incorporação desse íon em moléculas orgânicas e evitar os sintomas de toxidez, aumentando a taxa de translocação de esqueletos de carbono das folhas para as raízes. Deste modo, níveis elevados de absorção do amônio reduz os níveis de ácidos orgânicos e aumenta o consumo de 2-oxoglutarato, com acúmulo de glutamina, levando ao desequilíbrio entre o metabolismo de aminoácidos e ácidos orgânicos (HACHIYA et al., 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. B.; SOUZA, M. O.; MIRANDA, F. M.; RODRIGUES, T. G. S.; DIAS, F. S. Growth and Evaluation of Phenolic Compounds in *Physalis angulata* L. at Two Different Periods in the Bahia Reconcavo, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n.10, p. 145-155, 2017

AGRELL, D.; LARSSON, C.M.; LARSSON, M. et al. Inicial kinetics of ¹⁵N-nitrate labeling of roots and shoot N fractions of Barley cultured of different relative addition rates of N-nitrate. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 923-931, 1997.

ALAMINO, D. A. **Características agronômicas de fisalis (*Physalis pubescens*L) produzida por diferentes métodos e substratos e aspectos anatômicos e fitoquímicos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco/PR, 2011.

ALVARENGA, M. **Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004.

AMARAL, A.C.F.; SIMÕES, E.V.; FERREIRA, J.L.P. **Coletânea Científica de plantas de uso medicinal**. Rio de Janeiro:Fio Cruz, 2005. 220 p.

ANTÚNEZ-OCAMPO, O. M.; SANDOVAL-VILLA, M.; ALCÁNTAR-GONZÁEZ, G.; SOLÍS-MARTÍNEZ, M. Aplicación de amonio y nitrato en plantas de *Physalis peruviana* L. **Agrociencia**, v. 48, p. 805-817, 2014.

BARRETO, R. F.; CRUZ, F. J. R.; GAION, L. A.; PRADO, R. M.; CARVALHO, R. F. Accompanying ions of ammonium sources and nitrate:ammonium ratios in tomato plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 181, p. 382-387, 2018.

BARTELHEIMER, M.; POSCHLOD, P. The response of grassland species to nitrate versus ammonium coincides with their pH optima. **Journal of Vegetation Science**, v. 25, p. 760-770, 2014.

- BATISTA, M. M. F.; VIÉGAS, I. J. M.; FRAZÃO, D. A. C.; THOMAZ, M. A. A.; SILVA, R. C. L. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 315-318, 2013.
- BERTONCELLI, D. J.; OLIVEIRA, M. C.; PASSOS, A. I.; CASAGRANDE, T. H.; ARIATI, A. C. Agronomic aspects of two *Physalis* species as a function of nitrogen fertilization, v. 8, n. 2, p. 230-238, 2017.
- BLACKWELL, R. D.; MURRAY, A. J. S.; LEA, P. J. Inhibition of Photosynthesis in Barley with Decreased Levels of Chloroplastic Glutamine Synthetase Activity. **Journal of Experimental Botany**, v.38, n.11, p. 1799-1809, 1987.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas, **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Constancy of nitrogen turnover kinetics in the plant cell: insights into the integration of subcellular N fluxes. **Planta**, v. 213, n. 2, p. 175-181, 2001.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal Plant Physiology**, v. 156, p. 567-584, 2002.
- CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 277-303, 1999.
- CARVALHO, M. A. C.; FURLANI JUNIOR, E.; ARF, O.; SÁ, M. E.; PAULINO, H. B.; BUZETTI, S. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio e teores foliares deste nutriente e de clorofila em feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 25, p. 445-450, 2003.

CARNEIRO, M. M. L. C. et al. Fotorrespiração e metabolismo antioxidante em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 66-73, 2015.

CASTAÑEDA-SALINAS, C. et al. Respuesta de plântulas de uchuva (*Physalis peruviana* L.) a diferentes concentraciones de nitrato y amônio. **Revista Bio Ciencias**. v.2, n.3, p.148-153, 2013.

CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. G. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v. 89, p. 557-562, 1997.

CRUZ, J. L.; SOUZA FILHO, L.F.S.; PELACANI, C.R. Influência da adubação fosfatada sobre o crescimento do camapu (*Physalis angulata* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.3, p.360-366, 2015.

CURI, P. A. et al. Characterization of different native american physalis species and evaluation of their processing potential as jelly in combination with brie-type cheese. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 112-119, 2017.

EVANS J. R. Acclimation by the thylakoid membranes to growth irradiance and the partitioning of nitrogen between soluble and thylakoid proteins. In: EVANS J. R.; CAEMMERER, S.; ADAMS W. W. **Ecology of photosynthesis in sun and shade**. III (eds).Melbourne: CSIRO, 1989. p. 93- 106.

FERREIRA, M. M. M.; FERREIRA, G. B.; FONTES, P. C. R.; DANTAS, J. P. Índice SPAD e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo. **Ceres**, v. 53, p. 83-92, 2006.

FISCHER, K.; BARBIER, G. G.; HECHT, H-J.; MENDEL, R. R.; CAMPBELL, H. B.; SCHWARZA, G. Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active Site. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1167-1179, 2005.

FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p. 219-235, 2000.

GUIMARÃES, E. T. et al. Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of Leishmania sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 945-949, 2010.

GUO, S.; BRÜCK, H.; SATTELMACHER, B. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. **Plant Soil**, v. 239, p.267–275, 2002.

GUO, X-R.; ZU, Y-G.; TANG, Z-H. Physiological responses of *Catharanthus roseus* to different nitrogen forms. **Acta Physiology Plantarum**, v. 34, p. 589-598, 2011.

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

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J. et al. **Physiology and determination of crop yield**. Minnesota: American Society of Agronomy, 1994. p. 285-302.

HUNZIKER, A.T. **Genera Solanacearum**: The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. Ruggell: A.R.G. GantnerVerlang K.G, 2001. 500 p.

ISHIYAMA, K. et al. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.16598-16605, 2004.

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.

- KAWACHI, T. Y. et al. Role of xylem sap nitrate in regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 79-85, 2002.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2004. 452 p.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo III. 2. ed. São Paulo: BASF, 2000. 721 p.
- KLOTZ, M. G.; STEIN, L. Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. **FEMS Microbiol Lett**, v. 278, n. 2, p. 146-156, 2008.
- LACERDA, C. F.; FILHO, J. E.; PINHEIRO C.B. **Fisiologia Vegetal**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007. Disponível em <<http://www.fisiologiavegetal.ufc.br/apostila.htm>> Acesso em: 30 de setembro 2018.
- LEITE, R. S.; TANAN, T. T.; NASCIMENTO, M. N.; OLIVEIRA, L. M.; ABREU, P. A. S. Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n.2, p. 145-151, 2017.
- LI, Y. Z.; PAN, Y. M.; HUANG, X. Y.; WANG, H. S. Withanolides from *Physalis alkekengi* var. francheti. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n.12, p. 2284-2291, 2008.
- LILLO, C.; LEA, U.S.; LEYDECKER, M-T.; MEYER, C. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme in vivo and nitrite accumulation. **Plant Journal**, v. 35, p. 566-573, 2003.
- LILLO, C.; MEYER, C.; LEA, U. S.; PROVAN, F; OLTEDAL, S. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1275-1282, 2004.

LIU, G.; DU, Q.; LI, J. Interactive effects of nitrate-ammonium ratios and temperatures on growth, photosynthesis, and nitrogen metabolism of tomato seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 41-50, 2017.

LORENZI, H; MATOS, M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2008. 512 p.

MAE, T. Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis and yield potential. **Plant and Soil**, v. 196, p. 201-210, 1997.

MAKINO, A. Rubisco and Nitrogen Relationships in Rice: Leaf Photosynthesis and Plant Growth. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 49, v. 3, p. 319 - 327, 2003.

MARIN SISLEY, G. M. et al. Actividad inmunoestimulante del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Physalis angulata* L. en ratas albinas cepa Holtzman. **Revista Peruana de Medicina Integrativa**. v. 2, n.1, p. 38-46, 2017.

MATSUMURA, A. T. **Controle da atividade da reductase do nitrato em plantas de abacaxizeiro submetidas a baixas temperaturas em diferentes fases do ciclo diurno**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MEZZALIRA, E. J.; VILLA, F.; PIVA, A. L.; SANTIN, A.; MELGAREJO, M. A. A. Initial development of physalis species under growing environments. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 3, p. 293-301, 2017.

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 of Botany**, v. 53, p. 979–987, 2002.

MIFLIN, B.J., LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, v.15, p.873-885, 1976.

OAKS, A. A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. **Bioscience**, v. 42, p. 103-111, 1992.

PARRA-TERRAZA, S.; SALAS-NÚÑEZ, E.; VILLARREAL-ROMERO, M.; HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; SÁNCHEZ-PEÑA, P. Relaciones nitrato/amônio/urea y concentraciones de potássio em la producción de plântulas de tomate. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 16, n. 1, p. 37-47, 2010.

PINTO, N. B. et al. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. **Phytomedicine**, v. 17, p. 740-743, 2010.

QUEIROGA, R. C. F. et al. Influência de doses de nitrogênio na produtividade e qualidade do melão *Cantalupensis* sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 25 n. 4, 2007.

RAJASEKHAR, V.K.; GOWRI, G.; CAMPBELL, W. H. Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. **Plant Physiology**, v. 88, p. 242-244, 1988.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 163-171, 2006.

ROTH, R. et al. Bundle sheath defective, a mutation that disrupts the coordinated development of bundle sheath and mesophyll cells in maize leaf. **The Plant Cell**, v. 8, p. 915-927, 1996.

RUFATO, A. R.; RUFATO, L.; LIMA, C. S. M.; MUNIZ, J. A cultura da *Physalis*. In: KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L.; PELIZZA, T. R. (Org.). **Pequenas frutas**. Florianópolis: UDESC, 2013.

SECHLEY, K.A.; YAMAYA, T.; OAKS, T. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. **Internacional Review Cytology**, v. 134, p. 85-163, 1992.

SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 4, p. 344-351, 2005.

SOUZA, T. R.; SALOMÃO, L. C.; ANDRADE, T. F.; VILLAS BÔAS, R. L.; QUAGGIO, J. A. Medida indireta da clorofila e sua relação com o manejo da adubação nitrogenada em plantas cítricas fertirrigadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 993-1003, 2011.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L.; RODRIGUES, I.M.C. 2015 **Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14696>. Acesso em: 09 jan. 2019.

STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 6, p. 583-621, 2002.

STOKING, C. R.; ONGUN, A. The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. **American Journal of Botany**, v.49, n.3, p.284-289, 1962.

SUN, C. et al. Antiproliferative and anti-inflammatory withanolides from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1586-1597, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**, 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2017.

TANAN, T. T.; NASCIMENTO, M. N.; LEITE, R. S. Produção e caracterização dos frutos de espécies de *Physalis* cultivadas no semiárido baiano. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n. 3, p. 113-121, 2018.

TCHERKEZ, G.; HODGES, M. How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interaction with (photo) respiration in C3 leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.1685-1693, 2008.

THOMÉ, M.; OSAKI, F. Adubação de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento de *Physalis* spp. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 1, p. 11-18, 2010.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis*: uma revisão sobre vitasteróides. **Química Nova**, v. 23, n.1, p. 47-57, 2000.

VALARINI, M.J.; GODOY, R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanuscajan* (L.) Millsp). **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 500-504, 1994.

VARGAS-PONCE, O.; MARTÍNEZ, J. S.; TAVARES, M. P. Z.; MARES, L. E. V. Traditional management of a small-scale crop of *Physalis angulata* in Western Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 63, n. 8, p. 1383-1395, 2016.

WARD, M. H.; RUSIECKI, J. A.; LYNCH, C. F.; CANTOR, K. P. Nitrate in public water supplies and the risk of renal cell carcinoma. **Cancer Causes Control**, v. 18, p. 1141-1151, 2007.

WARREN, C. R.; DREYER, E.; ADAMS, M. A. Photosynthesis-Rubisco relationships in foliage of *Pinus sylvestris* in response to nitrogen supply and the proposed role of Rubisco and amino acids as nitrogen stores. **Trees**, v. 17, n. 4, p. 359-366, 2003.

WEGER, H.G.; TURPIN, D.H. Mitochondrial respiration can support NO_3^- and NO_2^- reduction during photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 89, p. 409-415, 1989.

CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM FOLHAS DE *Physalis angulata* L. UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGIAS¹

¹“Spectrophotometric Determinations of Chloroplastidic Pigments in *Physalis angulata* L. Leaves Using Different Methodologies”. Artigo publicado em Journal of Agricultural Science; vol. 9, n. 11, p. 117-122, 2017

Determinação espectrofotométrica de pigmentos cloroplásticos em folhas de *Physalis angulata* L. utilizando diferentes metodologias

Tamara Torres Tanan¹, Marilza Neves do Nascimento², Romeu da Silva Leite², David Santana Guimarães²

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil

Correspondence: Tamara Torres Tanan, Postgraduate Program in Plant Genetic Resources, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, Labio, Novo Horizonte, Feira de Santana, BA, CEP: 44036900, Brasil. E-mail: tamara.tanan@yahoo.com.br

Resumo

Os objetivos desse trabalho foram comparar os diferentes protocolos para extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos, considerando diferentes solventes, tempo de extração e temperatura, e determinar a melhor metodologia para uso em folhas de *Physalis angulata* L. Foi avaliada a eficiência da imersão de discos foliares em álcool 95%, acetona 80% e dimetilsulfóxido (DMSO) por 24, 48 e 72 horas. Também foi avaliado o efeito da temperatura na extração com o DMSO, sendo os tubos colocados à temperatura ambiente e em banho-maria a 65°C. Esses protocolos foram comparados com a metodologia clássica de maceração do tecido vegetal em acetona 80% seguida de filtração, que se mostrou a mais eficiente para plantas de *Physalis angulata*, sendo indicado para o uso em laboratório. O uso de altas temperaturas (65 °C) é dispensável no processo de extração de clorofilas com o DMSO, sendo a temperatura ambiente mais eficiente na extração de carotenoides. Considerando o teor de clorofila total, o uso da técnica de imersão de discos foliares em solvente é aceitável, com a utilização do álcool 95% por 24 horas de incubação, sendo também a alternativa mais viável economicamente.

Palavras-chave: acetona, dimetilsulfóxido, etanol, solventes

Abstract

The aim of this study was to compare different protocols for extraction and quantification of photosynthetic pigments, considering different solvents, extraction time and temperature, to determine the best methodology for *Physalis angulata* L. leaves. The efficiency of immersion of leaf discs in 95% ethanol, 80% acetone and dimethyl sulfoxide (DMSO) was evaluated for 24, 48 and 72 hours. The effect of temperature on extraction with DMSO was also evaluated, with the samples incubated at room temperature and in a water bath at 65 °C. These protocols were compared with the classical methods of plant tissue maceration in 80% acetone followed by filtration, which proved to be the most efficient for *Physalis angulata* plants and indicated for use in the laboratory. The use of high temperatures (65 +°C) is not necessary for the chlorophyll extraction process with DMSO, the room temperature is most efficient in the extraction of carotenoids. Considering the total chlorophyll content, the leaf discs immersion technique in a solvent is acceptable, with 95% ethanol and 24 hours incubation and the most economically viable alternative.

Keywords: acetone, dimethyl sulfoxide, ethanol, solvents

Introdução

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nos vegetais. Estudos mostram que os pigmentos cloroplastídicos são os mesmos em uma grande variedade de plantas, sendo as diferenças aparentes na cor do vegetal devido à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados (Streit, Canterle, Canto & Hecktheuer, 2005; Von Elbe, 2000). A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a etapa fotoquímica, correspondendo a 75% dos pigmentos verdes totais em plantas. Os demais pigmentos, conhecidos por pigmentos acessórios, como a clorofila *b* e os carotenoides, auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (Taiz & Zeiger, 2004).

Os pigmentos fotossintéticos encontram-se nos cloroplastos e são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, na forma de ATP e NADPH e, por essa razão, são estreitamente relacionados com a eficiência fotossintética das plantas e produtividade primária (Taiz & Zeiger, 2004). A determinação do conteúdo de pigmentos foliares representa importante ferramenta em estudos de fisiologia vegetal, quer seja para caracterização do material, quer seja para a distinção entre tratamentos ou interação entre plantas e fatores

ambientais (Lambers, Chapin & Pons, 1998). Como o nitrogênio é constituinte da molécula de clorofila, o teor desse pigmento na folha também é utilizado para predizer o nível nutricional de nitrogênio em plantas (Silveira, Braz & Didonet, 2003).

A extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos baseiam-se nas propriedades de absorvância e refletância dos constituintes das folhas, podendo ser um método destrutivo ou não (Lichtenthaler, 1987). A clorofila possui ligações frágeis (não-covalentes) com a membrana do tilacóide, e essas podem ser rompidas com a utilização de solventes orgânicos, sendo os solventes polares como a acetona, o etanol e a dimetilformamida os mais eficazes (Streit et al., 2005). O uso do dimetilsulfóxido (DMSO) também se mostra eficiente para extração completa dos pigmentos, sendo de mais fácil uso, já que requer apenas imersão do material foliar em um volume conhecido deste solvente (Barnes, Balaguer, Manrique, Elvira & Davison, 1992). A escolha do método ideal para extração de clorofila vai depender da natureza, polaridade e grau de pureza do solvente, da temperatura e do tempo de incubação, e da escolha das equações utilizadas para calcular as concentrações das clorofilas (Ritchie, 2008; Tait & Hik, 2003).

As características morfológicas e anatômicas das folhas das diferentes espécies também influenciam no processo de extração dos pigmentos fotossintéticos, sendo necessária a avaliação da eficiência do solvente utilizado. Em algumas frutíferas, como *Ficus carica*, *Diospyros kaki* e *Prunus persica*, já foram relatadas maior eficiência para extração usando acetona 80% (Barbosa, Scopel & Vieira, 2008), em *Vitis vinífera*, o DMSO foi mais eficaz comparado à acetona 80% (Santos et al, 2007). Em outros casos, não é observada diferença no uso dos diferentes solventes, como em folhas de abacaxi (*Ananas comosus*) (Barboza, Portes & Teixeira 2008).

A *Physalis angulata* L. é uma espécie frutífera, pertencente à família Solanaceae, caracterizada pela presença de frutos de sabor adocicado e de alto valor nutracêutico, e que se destaca pela produção de metabólitos secundários com amplo potencial medicinal (Tomassini, Barbi, Ribeiro & Xavier, 2000; Lorenzi & Matos 2008). Apesar da importância da espécie, esta carece de estudos básicos relacionados à fisiologia, como a extração e quantificação de pigmentos fotossintéticos. Alguns estudos que utilizam o teor de clorofila para distinção entre tratamentos em espécies de *Physalis* comumente usam a acetona 80% (Bertoncelli, Alamino, Oliveira, Marchesan & Loss, 2015; Passos, 2013), entretanto não há avaliação da eficiência dos diferentes solventes para nenhuma espécie do gênero. Arruda et al. (2014) constataram maior

eficiência de extração com a acetona 80% para *Solanum paniculatum*, espécie da mesma família da *P. angulata*.

A abundância dessas moléculas varia de acordo com a espécie vegetal, o que demanda ajustes metodológicos para que a extração e conservação desses pigmentos ocorram com eficiência. Desse modo, esse trabalho tem como objetivo comparar os diferentes protocolos para extração e quantificação dos pigmentos fotossintéticos e determinar a melhor metodologia para uso em folhas de *Physalis angulata*.

Material e Métodos

Esse trabalho foi realizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Brasil, em março de 2017.

As amostras de folhas de *Physalis angulata* foram provenientes de plantas cultivadas em sistema hidropônico em solução de Sarruge modificado para o cultivo de *P. angulata* (Leite, Tanan, Nascimento, Oliveira & Abreu, 2017). Foram utilizadas oito plantas escolhidas aleatoriamente, das quais foi retirado o primeiro par de folhas completamente expandidas para a determinação dos teores de pigmentos cloroplastídicos. Doze discos de 10mm de diâmetro foram retirados de cada folha e imediatamente transferidos para tubos de ensaio envoltos com papel alumínio, para excluir a luminosidade, contendo 5 mL dos diferentes extratores.

Foi analisado o efeito de três extratores: acetona 80%, álcool 95% e dimetilsufóxido (DMSO) e três períodos de incubação: 24, 48 e 72 horas. Os tubos foram vedados, e mantidos no escuro à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Paralelamente, também foi avaliado o efeito da temperatura na extração com o DMSO, sendo os tubos colocados em banho-maria a 65°C por 1 h e as leituras realizadas imediatamente e após 24 horas de incubação em temperatura ambiente. Para efeito de comparação, procedeu-se a extração dos pigmentos cloroplastídicos das mesmas folhas por meio de maceração do tecido vegetal e posterior filtração utilizando a acetona 80% como solvente (Arnon, 1949).

Após cada período de incubação, determinou-se a absorbância das amostras utilizando-se cubetas de quartzo em espectrofotômetro de feixe duplo (FEMTO 800XI). Os comprimentos de onda foram variáveis de acordo com o solvente utilizado e os teores de clorofila *a*, *b*, total (*a+b*) e carotenoides foram calculados segundo as equações propostas por Lichtenthaler & Wellburn (1986), para a acetona 80%; por Lichtenthaler (1987), para o álcool; e por Wellburn (1994) para o DMSO. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, envolvendo um fator qualitativo (método de extração) e outro quantitativo

(tempo de extração). O fator quantitativo foi analisado por meio de regressão não-linear utilizando-se o software *SigmaPlot* v.11.0 (Systat Software Inc., Chicago, USA), enquanto o qualitativo foi submetido a análise de variância. O teste de Tukey foi aplicado para comparação de médias com 5% de significância utilizando-se o software *Sisvar* v.5.3 (Ferreira, 2008).

Resultados e Discussão

Com relação ao tempo necessário para extração das clorofilas, o álcool 95% e o DMSO mostraram-se mais rápidos, sendo eficiente com 24 horas de incubação. Para a acetona 80%, o tempo necessário foi de 48 horas, no qual já evidenciava a extração completa dos pigmentos. Com ambos os solventes utilizados, os dados foram ajustados para o mesmo modelo, correspondendo a uma hipérbole retangular, sendo os ajustes altamente eficientes, como evidenciam os valores de R^2 acima de 0,95 obtido para as clorofilas, com exceção para os carotenoides (Figura 1). Resultado similar foi obtido por Barbieri Junior, Rossiello, Morenz & Ribeiro (2009), em folhas de capim-Tifton 85, para a clorofila em ambos os extratores.

O teor de clorofilas *a*, *b* e total extraídas com o uso do DMSO não apresentaram efeito significativo quando submetidos ao tratamento a 65°C, com 1h ou 24h de incubação, comparado à temperatura ambiente, evidenciando que para *P. angulata* o processo de extração não necessita de altas temperaturas, o que o torna mais simples (Tabela 1). Tait & Hik (2003) também constataram que não foi necessário atingir 65°C para a extração das clorofilas em gramíneas. Temperaturas mais elevadas (acima de 40°C) são necessárias para a extração completa de clorofila em líquens e folhas grossas e altamente cutinizadas (Barnes et al., 1992; Tait & Hik, 2003), o que não é o caso da *P. angulata*. Ademais, a incubação de discos foliares em DMSO à temperatura ambiente também favoreceu a extração de carotenoides.

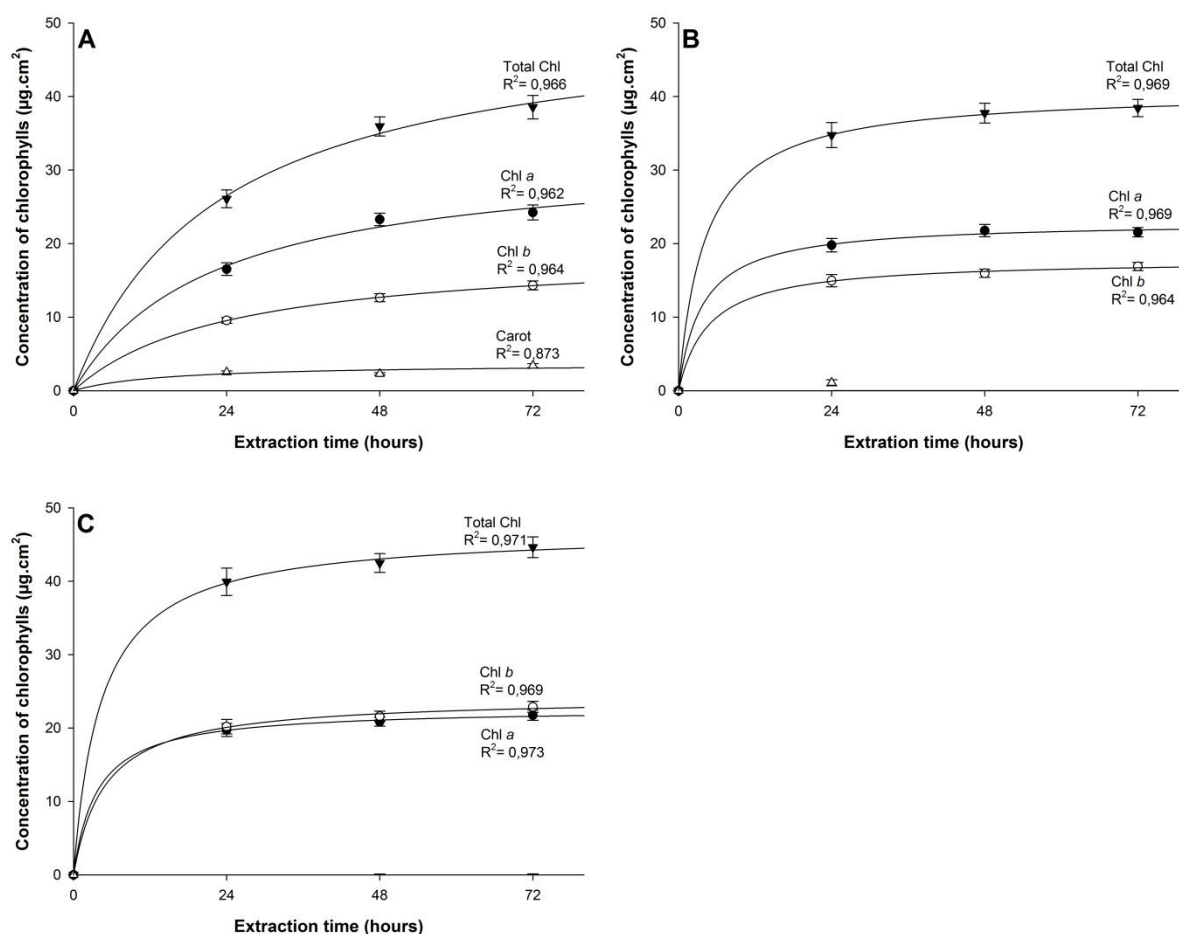


Figura 1. Teores de clorofila *a*, *b* e total (*a* + *b*) e carotenóides nas folhas de *Physalis angulata* extraídos com acetona 80% (A), DMSO (B) e etanol 95% (C). A barra corresponde ao erro padrão da média.

Considerando o método e o solvente utilizado e levando em conta o melhor tempo de incubação observado, os resultados diferiram entre as classes de pigmentos (Tabela 1). A concentração de clorofila *a* seguindo a metodologia de imersão de disco foliar em solvente não apresentou diferenças significativas entre os extratores utilizados. Contudo, comparando com o método clássico de maceração da folha em acetona 80% (Arnon, 1949), observou-se que esta diferiu significativamente das outras metodologias avaliadas, apresentando maiores valores. A maceração da folha rompe com facilidade o tecido facilitando a remoção das moléculas de clorofila (Streit et al., 2005), podendo ocasionar aumento na extração utilizando essa técnica. Esses dados diferem do encontrado por outros autores no qual a imersão de discos foliares em DMSO se mostrou mais eficiente que os demais métodos (Barbieri Junior et al., 2010; Cruz et al., 2007).

Tabela 1. Teor de pigmentos fotossintéticos extraídos de folhas de *Physalis angulata* por diferentes solventes e metodologias.

Método	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g.cm}^2$)	Chl <i>b</i> ($\mu\text{g.cm}^2$)	Carotenoides ($\mu\text{g.cm}^2$)	Total Chl ($\mu\text{g.cm}^2$)
Acetona 80% c/ maceração	28.67a	24.56a	1.61ab	53.23a
Acetona 80% s/ maceração	23.29b	12.64c	2.35a	35.94b
Etanol 95%	20.86b	21.55ab	0.18b	42.42ab
DMSO	21.77b	15.97bc	1.83a	37.74b
DMSO 65°C	21.89b	18.40abc	0.14b	40.29b
DMSO 65°C+24h	20.95b	19.28abc	0.11b	40.24b

Nota. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A imersão dos discos no extrator ocorreu por 48h para acetona 80% e 24h para o etanol 95% e DMSO.

Para extração da clorofila b vários métodos foram eficientes, com os maiores valores observados com a maceração do tecido em acetona 80%, seguidos dos discos imersos em álcool 95% e DMSO a 65°C após 1h e 24h de incubação, não havendo diferença estatística entre eles. O contrário foi observado para o teor de carotenoides, onde os discos imersos em acetona 80% e DMSO a temperatura ambiente apresentaram as maiores concentrações (Tabela 1). O teor de carotenoides totais pode ser facilmente determinado a partir da medição dos máximos de absorção da clorofila *a* e *b*, e adicionalmente o máximo de absorção no comprimento de onda de 470-480 nm. Deste modo, uma determinação correta de carotenoides requer uma determinação correta da concentração de clorofila *b*. Se o nível de clorofila *b* for superestimado, os valores resultantes para os carotenoides totais serão muito baixos e vice-versa (Lichtenthaler, 1987).

As diferenças entre a eficiência dos solventes dependem do tipo de planta e da estrutura da parede celular (Dere, Günes & Sivaci 1998). Cada tipo de tecido vegetal se adequa a um tipo de extrator melhor do que outro. Alguns deles são ineficientes, alguns são altamente eficientes, mas ainda requerem maceração e centrifugação ou filtração, e alguns demandam a imersão do tecido em solventes aquosos onde os pigmentos são extraídos (Wellburn, 1994). Para as plantas de *P. angulata*, considerando o teor de clorofila total (*a* + *b*), a maior eficiência de extração foi obtida utilizando a técnica de maceração com acetona 80%, seguida de imersão de discos foliares em álcool 95% (Tabela 1), não havendo diferenças estatísticas entre eles.

Para a definição do melhor método, outros fatores devem ser levados em conta. A acetona é inapropriada para o trabalho em campo devido à volatilidade, propensão para vazar

dos contentores, inflamabilidade e, apesar dos melhores resultados observados, é admissível perder certa parcela de precisão, e utilizar outro método em condições de campo envolvendo um elevado número de tratamentos e repetições (Ritchie, 2008; Barbieri Junior et al, 2010). Protocolos em que parte do tecido vegetal é imersa em solvente são recomendados devido à praticidade, a possibilidade de preparar um grande número de amostras em pouco tempo. Além disso, uma vantagem adicional é que as leituras espectrofotométricas podem ser feitas em extratos armazenados em local escuro e fresco após alguns dias (Hiscox & Israelstam 1979; Barnes et al., 1992).

O uso do DMSO é recomendado por diversos autores (Cruz et al., 2007; Santos et al., 2007; Pompelli et al., 2013) e possui elevada capacidade de difusão através de membranas semipermeáveis sendo reconhecido também por sua eficiência como carreador de proteínas, o que proporciona agilidade no processo, sendo os extratos preparados com o DMSO mais estáveis que com a acetona (Barnes et al, 1992; Cruz et al, 2007). Entretanto, alguns autores relatam a ineficiência do DMSO na extração de clorofila b em plantas *in vivo* (Barnes et al, 1992; Shinano et al, 1996). O álcool apresenta a vantagem de ser mais prático, de fácil transporte e manuseio, e ser muito mais barato que os demais solventes avaliados. Contudo, os picos de absorção da clorofila a são normalmente menores e mais largos e tendem a interferir na absorbância da clorofila b, podendo subestimar a concentração de pigmentos em extratos foliares (Ritchie, 2008; Pompelli et al, 2013).

Conclusões

A utilização do protocolo de maceração do tecido em acetona 80% seguido de filtração é o mais eficiente para extração de clorofilas em plantas de *Physalis angulata*, sendo indicado para o uso em laboratório. Em condições de campo, pode-se utilizar a técnica de imersão de discos foliares em solvente, com a utilização do álcool 95% por 24 horas de incubação, sendo também o mais viável economicamente.

Referências

- Arruda, C. T. B. S., Barbosa, A., Espinheira, I. H. L., Lopes, S. S. M., Silva, A. B., & Mapeli A. M. Uso de diferentes métodos na determinação dos teores de clorofila em *Solanum paniculatum* no Cerrado do Oeste da Bahia. *1ª Jornada de Química da UFOB, Anais... Barreiras*, 2014
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.

- Barbieri Junior, E., Rossiello, R. O. P., Morenz, M. J. F. & Ribeiro, R. C. (2010). Comparação de métodos diretos de extração e quantificação dos teores de clorofilas em folhas do capim-Tifton 85. *Ciência Rural*, 40, 633-636. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010000300022>.
- Barbosa, J. Z., Scopel, W., & Vieira, M. L. (2008). Procedimentos para extração de pigmentos fotossintetizantes em espécies frutíferas. *Evidência*, 8(1-2), 29-42. <http://dx.doi.org/10.18593/eba.v8i1-2.1871>
- Barboza, S. B. S. C., Portes, T. A., & Teixeira, J. B. (2008). *Diferentes métodos para extração de clorofilas em folhas de abacaxi cultivadas in vitro*. Aracaju: Departamento de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe, Embrapa Tabuleiros Costeiros.
- Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., & Davison, W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 32(2), 85-100. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90034-Y](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90034-Y)
- Bertoncelli, D. J., Alamino, D. A., Oliveira, M. C., Marchesan, E. D., & Loss, E. M. C. (2015). Aspectos bioquímicos do desenvolvimento inicial de plantas de *Physalis* sob diferentes condições luminosas. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, 8(1), 37-46. <https://doi.org/10.5935/PAeT.V8.N1.04>
- Cruz, A. C. F., Santos, R. P., Iarema, L., Fernandes, K. R. G., Kuki, K. N., Araújo, R. F., & Otoni, W. C. (2007). Métodos comparativos na extração de pigmentos foliares de três híbridos de *Bixa orellana* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(Supl.2), 777-779. Retrieved from <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/658/557>
- Dere, S., Günes, T., & Sivaci, R. (1998) Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*, 22, 13-17. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.617.505&rep=rep1&type=pdf>
- Ferreira, D. F. (2008). SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6, 36-41.
- Hiscox, J. D., & Israelstam, G. F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12), 1332-1334. <https://doi.org/10.1139/b79-163>

- Lambers, J., Chapin, F. S., & Pons, T. L. (1998). *Plant physiological ecology*. New York: Springer-Verlag,.
- Leite, R. S., Tanan, T. T., Nascimento, M. N., Oliveira, L. M., & Abreu, P. A. S. (2017). Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 47(2), 145-151. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632016v4744652>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf in Different Solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, 148, 350- 382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lorenzi, H., & Matos, M. (2008). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas* (2nd ed.). Nova Odessa, SP: Plantarum.
- Passos, A. I. dos. (2013). *Adubação e assimilação de nitrogênio em duas espécies de Physalis* (Master's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Brazil). Retrieved from <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/623>
- Pompelli, M. F., França, S. C., Tigre, S. C., Oliveira, M. T., Sacilot, M., & Pereira, E. C. (2013) Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide, *Revista Brasileira de Biociências*, 11(1), 52-58. Retrieved from <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2281>
- Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115-126. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>
- Santos, R. P., Cruz, A. C. F., Iarema, L., Fernandes, K. R. G., Kuki, K. N., & Otoni, W. C. (2007). Avaliação da Eficiência do Dimetilsulfóxido na Extração de Pigmentos Foliare de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* Propagadas in vitro. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(supl. 2), 888-890. Retrieved from <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/733/617>
- Sarruge, J. R. (1975). Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, 1(3), 231-233.

- Shinano, T., Lei, T. T., Kawamukai, T., Inoue, M. T., Koike, T., & Tadano, T. (1996). Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls a and b from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo and oak. *Photosynthetica*, 32, 409-415.
- Silveira, P. M., Braz, A. J. B. P., & Didonet, A. D. (2003). Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 1083-1087. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000900009>
- Streit, M. N., Canterle, L. P., Canto, M. W., & Hecktheuer, L. H. H. (2005). As clorofilas. *Ciência Rural*, 35(3), 748-755. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>
- Tait, M. A., & Hik, D. S. (2003). Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? *Photosynthesis Research*, 78(1), 87-91. <http://doi.org/10.1023/A:1026045624155>
- Taiz, L., & Zieger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal* (3th ed.). Porto Alegre, RS: Artmed.
- Tomassini, T. C. B., Barbi, N. S., Ribeiro, I. M., & Xavier, D. C. D. (2000). Gênero *Physalis*: uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova*, 23(1), 47-57. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000100011>
- Von Elbe, J. H. (2000). *Colorantes*. In Fennema, O. W. *Química de los alimentos* (2nd ed.). Zaragoza: Wisconsin – Madison.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO (RN) EM TECIDOS FOLIAR E RADICULAR DE *Physalis angulata* L.: VARIAÇÕES DIURNAS E OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO²

²“Characterization of nitrate reductase activity (NR) in foliar and radicular tissues of *Physalis angulata* L.: diurnal variations and protocol optimization”. Artigo publicado na revista Australian Journal of Crops Science, v.13, n. 7, p. 1120-1125, 2019.

Caracterização da atividade da redutase do nitrato (RN) em tecidos foliar e radicular de *Physalis angulata* L.: variações diurnas e otimização do protocolo

Tamara Torres Tanan^{1*}, Marilza Neves do Nascimento², Alismário Leite da Silva³, David Santana Guimarães², Romeu da Silva Leite², Larissa de Souza Pereira³, Francisco dos Santos Neto³

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.

³Curso de Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.

Resumo: A redutase de nitrato é a primeira enzima da rota de assimilação do nitrogênio e a determinação da sua atividade requer adaptações para cada espécie vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação na atividade da RN ao longo do dia e a otimização das condições de ensaio em tecidos foliares e radiculares em *Physalis angulata*. A análise foi realizada em plantas cultivadas em sistema hidropônico e a atividade da RN baseou-se no método do ensaio *in vivo*. Foi observada ação da enzima na folha e na raiz, indicando dois sítios de assimilação no nitrato, com maior atividade no período luminoso. Na folha, a ação da RN aumenta após 4h de luminosidade, e na raiz, a atividade é alta durante a maior parte do dia, principalmente no momento de maior radiação solar e temperatura. As maiores atividades da RN foram obtidas quando se empregou: n-propanol 1%, 50 mM de KNO₃⁻, tampão fosfato com pH 7 e incubação por 75min em banho-maria, para ambos os tecidos.

Palavras-chaves: nitrogênio, atividade enzimática, ritmo diurno, camapú

Abstract: Nitrate reductase (NR) is the first enzyme in the nitrogen assimilation pathway and the determination of its activity requires modifications for each plant species. The goal of this work was to evaluate the variation of NR activity throughout the day and the optimization of assay conditions in foliar and radicular tissues of *Physalis angulata*. The analysis was done in plants cultivated in a hydroponic system at two months of age and the NR activity was based on the *in vivo* assay method. Enzyme activity was observed on leaf and root, indicating two sites of nitrate assimilation with a higher activity in the daylight. In the leaf, the NR activity

increased after 4h of luminosity, and in the root, we observed a high activity during most of the day, especially in periods of higher solar radiation and temperature. To obtain the highest activity of NR in both tissues should use n-propanol 1%, 50mM of KNO_3^- in a pH 7 phosphate buffer during 75 min incubation in water bath.

Keywords: nitrogen, enzyme activity, daylight rhythm, camapú

Abbreviations: aRN: _nitrate reductase activity, H_{\max} : _maximum humidity, H_{\min} : _minimum humidity, N: _nitrogen, RN: _nitrate reductase, T_{\max} : _maximum temperature, T_{\min} : _minimum temperature.

Introdução

A *Physalis angulata* L. é uma planta herbácea, pertencente à família Solanaceae, conhecida popularmente como camapú (Lorenzi and Matos, 2008). É uma espécie multiuso, pois, além de seus frutos, de sabor doce levemente ácido, terem potencial para ser explorado comercialmente (Curi et al., 2018), apresentam potencial medicinal, atribuído a sua composição fitoquímica onde se podem encontrar flavonoides, alcaloides e diferentes esteroides, destacando-se as fisalinas, presente nas folhas, caule e raízes, que possuem diversas propriedades farmacológicas, como atividade antiparasítica, antiviral e antineoplásica (Marin Sisley et al., 2017; Tomassini et al., 2000).

Apesar do seu potencial, o cultivo de *P. angulata* ainda é incipiente e as pesquisas acerca do seu manejo são escassas. No que diz respeito à nutrição mineral, alguns trabalhos foram realizados com a espécie (Cruz et al., 2015; Tanan et al., 2013; Thomé and Osaki, 2010). Leite et al. (2017) avaliaram a influência do nitrogênio (N), observando uma relação entre o aumento da dosagem e o maior crescimento e produção de frutos da planta. O N é o macronutriente mais requerido pelas plantas, com efeito direto na distribuição de fotoassimilados entre a parte vegetativa e reprodutiva, estando relacionada com a fotossíntese, ampliação do sistema radicular, absorção iônica de nutrientes e desenvolvimento celular (Queiroga et al., 2007).

Uma das fontes nitrogenadas mais importantes para os vegetais é o nitrato, que é a principal forma de N-inorgânico disponível para as plantas, entretanto, esse íon precisa ser reduzido para ser incorporado em moléculas orgânicas. Isso é realizado pela redutase do nitrato (RN), uma flavoproteína que realiza a primeira etapa da rota de assimilação do nitrogênio, a redução do nitrato para nitrito através do agente redutor NAD(P)H (Taiz and Zeiger, 2017),

assumindo portanto, papel de extrema importância no metabolismo vegetal (Delú-Filho et al., 1998). A RN possui vários mecanismos de regulação necessários para evitar o acúmulo de nitrito, considerado tóxico. As principais formas de controle estão em nível transcricional e pós-traducional. O primeiro ocorre em longo prazo e pode ser induzido pelo nitrato, luz, citocininas, sacarose e CO₂. O segundo é rápido, ocorre em minutos, sendo essencial na adaptação do metabolismo para mudanças diárias de luz/escuro e variações da intensidade luminosa (Matsumura, 2012).

O método de avaliação da atividade da RN pode ser feito *in vivo* e *in vitro*. O método *in vivo* tem sido amplamente utilizado como indicador do metabolismo do nitrogênio nos vegetais e consiste na incubação do tecido vegetal em meio que forneça condições ideais para a atividade da enzima, em condições de escuro, sendo a taxa de difusão do nitrito para a solução de incubação utilizada como indicadora da atividade da enzima (Lee and Titus, 1992). Esse método é menos laborioso e considerado, por alguns autores, como o mais adequado para a comparação da atividade da RN entre espécies diferentes ou entre tratamentos distintos (Crafts-Brandner and Harper, 1982; Singh, 1994; Cairo et al., 1994). Entretanto, tem como desvantagem a necessidade de se adaptar às condições de realização do ensaio, conforme a natureza do tecido vegetal (Jaworski, 1971).

Além disso, outro fator importante é o conhecimento do ritmo diurno da RN, que já foi observado em algumas plantas (Queiroz et al., 1993; Nievola and Mercier, 2001; Oliveira et al., 2005; Santos et al., 2014), indicando o aumento da atividade da RN foliar concomitante ao da intensidade luminosa. A determinação do horário ideal para a realização do ensaio é de extrema importância, fazendo coincidir com o período correspondente à máxima atividade da RN (Nievola and Mercier, 2001).

Cada espécie tem suas particularidades anatômicas e fisiológicas, sendo necessário o estabelecimento de condições apropriadas (Santos et al., 2014). Passos (2013) avaliou a atividade da RN em plantas de *Physalis peruviana* L. e *Physalis pubescens* L. sob diferentes doses de adubação nitrogenada, entretanto, o conhecimento do ciclo diurno e das condições ideais para realização da metodologia *in vivo* são inexistentes para todo o gênero. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a variação na atividade da redutase do nitrato ao longo do dia e a otimização das condições de ensaio em tecidos foliares e radiculares de plantas de *P. angulata*.

Material e Métodos

Local do estudo

O experimento foi realizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no período de julho a outubro de 2017.

Material vegetal e condução do experimento

As plantas foram obtidas a partir da sementeira em copos plásticos contendo solo oriundo da própria Unidade Experimental. As mudas foram transplantadas para o sistema hidropônico quando apresentam dois pares de folhas verdadeiras e aproximadamente 10 cm de altura.

O experimento foi conduzido em sistema hidropônico contendo solução de Sarruge modificada para o cultivo de *Physalis* (Leite et al., 2017), composta pelos seguintes macronutrientes em mg.L⁻¹: N=162; P=31; K=234,6; Ca=200,4; Mg=48,6; S=64,1.

A condutividade elétrica (CE) foi mensurada diariamente e a solução trocada quando a CE reduzia em 30% da inicial. O pH da solução foi mantido em 6,5. Para o controle de pragas, solução de Neem (*Azadirachta indica*) a 5% foi aplicada semanalmente.

As avaliações foram realizadas utilizando 15 plantas com dois meses de idade, quando iniciavam o estágio reprodutivo. Amostras do terço inferior da raiz e de folhas totalmente expandidas foram coletadas e imediatamente levadas ao laboratório onde foram lavadas com água destilada. O tecido radicular foi fragmentado em pedaços uniformes utilizando tesoura, e do tecido foliar foram retirados discos de 8mm de diâmetro com auxílio de furador.

Os dados climatológicos dos dias em que se realizaram as avaliações foram obtidos na Estação Climatológica da Universidade Estadual de Feira de Santana, BA (INMET, 2017) (Figura 2).

Análises laboratoriais

O ensaio *in vivo* da atividade da RN foi realizado segundo metodologia proposta por Jaworski (1971).

Para avaliação das variações diurnas da atividade da RN, amostras do tecido vegetal foram coletadas das 6 às 18 horas, em intervalos de 1 hora. 300 mg de tecido radicular e 200 mg (aproximadamente 20 discos) de tecido foliar frescos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de incubação, composto por tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5), n-

propanol 1% (v/v) e nitrato de potássio 0,1M. Os tubos foram envoltos em papel alumínio para excluir a luminosidade e submetidos a vácuo por 2 min. Posteriormente, foram incubados em banho-maria a 30 °C por 30 minutos, com agitação. Para o tecido radicular foi realizado, previamente ao vácuo, o borbulhamento com N₂ durante 1 minuto. Ao final do processo de incubação, retirou-se alíquota de 500 µL do meio e transferiu-se para tubos contendo o meio de reação composto por 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5N, 1 mL de N-2-naftil-etileno 0,02% e 1,5 mL de água destilada (Jaworski, 1971).

Para a otimização das condições de ensaio, as coletas foram realizadas às 11 horas para o tecido foliar e às 14 horas para o tecido radicular, considerando os resultados obtidos na avaliação das variações diurnas, utilizando-se as mesmas quantidades de material do experimento anterior. O procedimento consistiu de ensaios experimentais sequenciais ao primeiro, com modificação de apenas um fator a cada ensaio, tomando sempre para os próximos ensaios, o maior valor de atividade da enzima observado no resultado anterior.

A absorbância das amostras foi determinada utilizando-se espectrofotômetro de feixe duplo (FEMTO 800XI), ajustado para 540 nm. A atividade da RN foi estimada em µmol de nitrito liberado por 1 g de tecido fresco por hora de incubação (µmol g⁻¹h⁻¹ NO₂⁻) e foi calculada com base em equação linear obtida a partir da curva padrão do nitrito, previamente preparada.

Variáveis analisadas

Foi avaliada a variação da atividade do RN durante todo o dia (6:00 às 18:00 horas). Os efeitos da variação do tempo de incubação (15, 30, 45, 60 e 75 minutos), concentração de n-propanol no meio de incubação (1, 2, 3, 4 e 5%), concentração de KNO₃ (0, 50, 100, 150 e 200mM) e pH (4,3, 5,3, 6,3, 7,3 e 8,3) foram analisados.

Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey com 5% de significância utilizando-se o software *Sisvar* v.5.3 (Ferreira, 2008), e submetidos à análise de regressão utilizando-se o software *SigmaPlot* v.11.0 (Systat Software Inc., Chicago, USA).

Resultados e Discussão

Varição diurna

A atividade da redutase do nitrato (aRN) em plantas de *P. angulata* foi observada tanto nos tecidos radiculares como foliares, indicando dois sítios de assimilação do N. Por ser uma enzima que tem sua atividade influenciada por diversos fatores ambientais, foram observadas variações ao longo do dia em ambos os tecidos (Figura 1).

Na raiz, a atividade pôde ser observada a partir das primeiras horas da manhã, com dois picos, às 10 e 14 horas, que coincidem com o período de maior radiação solar e temperatura (Figura 1 e 2). O inverso ocorreu nos tecidos foliares, no qual menor aRN foi observada nesses mesmos momentos. O nitrato absorvido pode ser reduzido na raiz ou transportado via xilema para ser reduzido nas folhas, esse transporte ocorre pela geração de pressões negativas dentro do xilema, devido às forças capilares nas paredes celulares de folhas transpirantes (Taiz and Zeiger, 2017). Nos momentos mais quentes e com alta radiação solar, as plantas tendem a fechar seus estômatos para evitar a perda de água, reduzindo assim o fluxo de translocação pelo xilema e, conseqüentemente, o transporte de nitrato das raízes para as folhas, com a redução da atividade da RN foliar e o acréscimo da atividade na raiz, já que o aumento no teor de nitrato induz a transcrição do RNA mensageiro envolvido com a codificação da RN (Konishi and Yanagisawa, 2011).

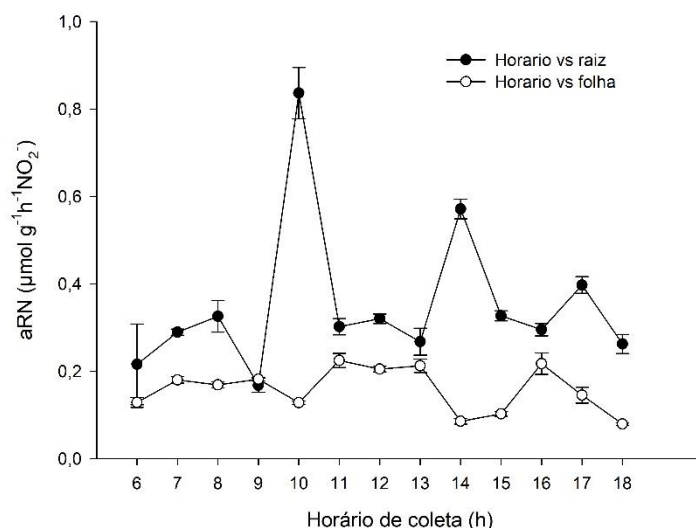


Figura 1. Variação diurna da atividade da Redutase do Nitrato em tecidos foliares e radiculares de *Physalis angulata* L.). A barra corresponde ao erro padrão da média.

Assim como o nitrato, a luz induz uma alta expressão dos genes da RN (Tischner, 2000; Lillo et al., 2001), o que foi percebido com a redução da aRN ocorrida ao final do período luminoso, principalmente nas folhas (Figura 1 e 2). A luz pode induzir a enzima de forma direta, mediada pelo fitocromo, ou indireta, por meio da fotossíntese e seus fotoassimilados (Rajasekhar et al., 1988; Lillo et al., 2004). Segundo Kaiser and Huber (2001), em condições normais de ativação e na presença de luz, a ação da RN seria da ordem de 70 a 90%, reduzindo para 10 a 30% no escuro, corroborando o observado nesse experimento, em que ao escurecer (18h), ocorreu uma redução de 67,7% da atividade observada nos períodos de maior intensidade luminosa.

Essa variação foi observado, também, por Nievola and Mercier (2001) em folhas de abacaxizeiro, que apresentaram maior aRN na presença de luz, e por Santos et al. (2014) que obtiveram, para folhas de cana-de-açúcar, valores máximos da aRN às 13h, indicando que a radiação solar global possa ser o fator climático que mais influência a atividade da enzima. Entretanto, para plantas de café foi observado um declínio gradual ao longo do período luminoso seguido por aumento da atividade nas primeiras horas de escuro (Queiroz et al., 1993). Essa alta sensibilidade às variações de claro/escuro da RN é controlada por um mecanismo pós-traducional que envolve a fosforilação de um resíduo de serina, seguida da ligação de uma proteína de transdução de sinal, inativando assim a enzima. Ao ser exposta à luz, ocorre o desligamento dessa proteína e a RN torna-se ativa novamente (Lea et al., 2006; Souza et al., 2002).

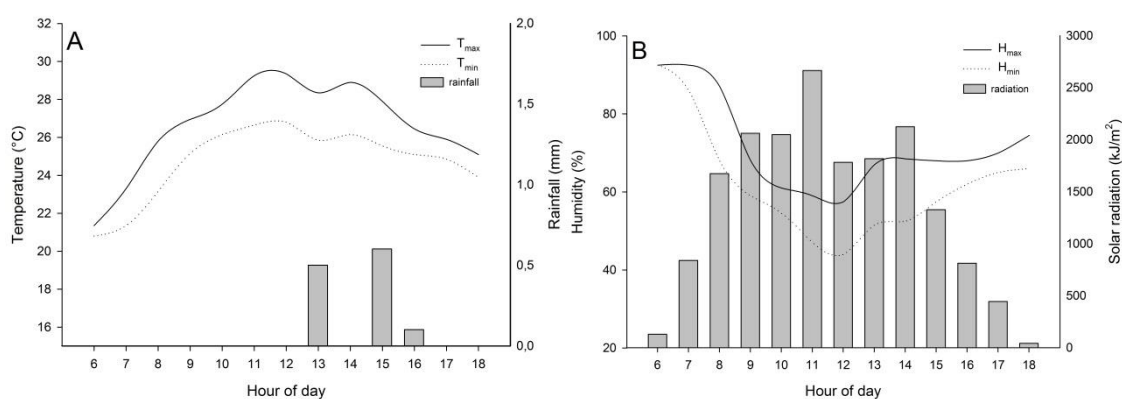


Figura 2. Dados meteorológicos obtidos na Estação Climatológica da Universidade Estadual de Feira de Santana, BA. Valores médios dos dias avaliados (A – pluviosidade e temperatura máxima e mínima; B – Radiação solar e umidade do ar máxima e mínima).

Efeito do tempo de incubação na atividade da RN

Em relação à otimização das condições de ensaio, observou-se um crescimento linear na aRN com o aumento do tempo de incubação para ambos os tecidos, sendo mais acentuado nas folhas (Figura 3A). Para a determinação da aRN é necessário que haja a difusão do nitrato disponível no meio para o tecido vegetal e, posteriormente, a liberação do nitrito, e a maior atividade da enzima, com o prolongamento do período de incubação, pode estar relacionada ao requerimento de tempo para completa infiltração do meio de reação (Oliveira et al., 2005), sendo variável de acordo à espécie e ao tecido de estudo. Para muitas plantas como o café, a pupunheira, o abacaxizeiro, a braquiária e em macroalgas já foram observados desempenhos similares de aumento da atividade da enzima com maior período de incubação (Meguro and Magalhães, 1982; Nievola and Mercier, 2001; Oliveira et al., 2005; Martins et al., 2009; Cazetta and Villela, 2004). De acordo com os resultados obtidos, foi adotado o tempo de 75 min de incubação do tecido vegetal para as análises posteriores, por proporcionar maior atividade da enzima.

Efeito da adição de n-propanol na atividade da RN

A entrada do nitrato e a liberação do nitrito do tecido vegetal pode ser aumentada com a adição de solvente ao meio, o que proporciona um aumento geral da permeabilidade da membrana, sendo o n-propanol um dos mais eficazes (Jaworski, 1971). Com relação a concentração de solvente utilizada nas folhas de *P. angulata* não houve diferença significativa para a atividade da enzima, entretanto, para o tecido radicular, o aumento da concentração do n-propanol levou a um decréscimo linear na aRN (Figura 3B). O uso de alguns solventes orgânicos, em altas concentrações, pode causar a desorganização da configuração de proteínas (Jamur and Oliver, 2010), e em tecido foliar o uso do n-propanol em altas concentrações pode causar difusão da clorofila no meio de incubação e afetar colorimetricamente a estimativa da atividade da RN (Streeter and Bosler, 1972), entretanto esses efeitos variam de acordo as características celulares e anatômicas das plantas de diferentes espécies.

Em folhas de cana-de-açúcar a redução da aRN foi observada com o aumento da concentração de n-propanol (Santos et al., 2014), já em *Citrus sinensis*, para o tecido radicular não foi constatada diferença entre as concentrações, entretanto, para a folha ocorreu redução a partir de 3% (Dovis et al., 2014) e, em abacaxizeiro, Nievola and Mercier (2001) recomendam o uso de n-propanol a 3% e 4% para tecido radicular e foliar, respectivamente. Essas diferenças observadas comprovam a necessidade da adequação do método para cada espécie, sendo nesse

trabalho, com *P. angulata*, adotada a concentração de 1% que proporciona maior aRN radicular. Para o tecido foliar foi adotada a mesma concentração, já que não houve diferença entre as concentrações avaliadas.

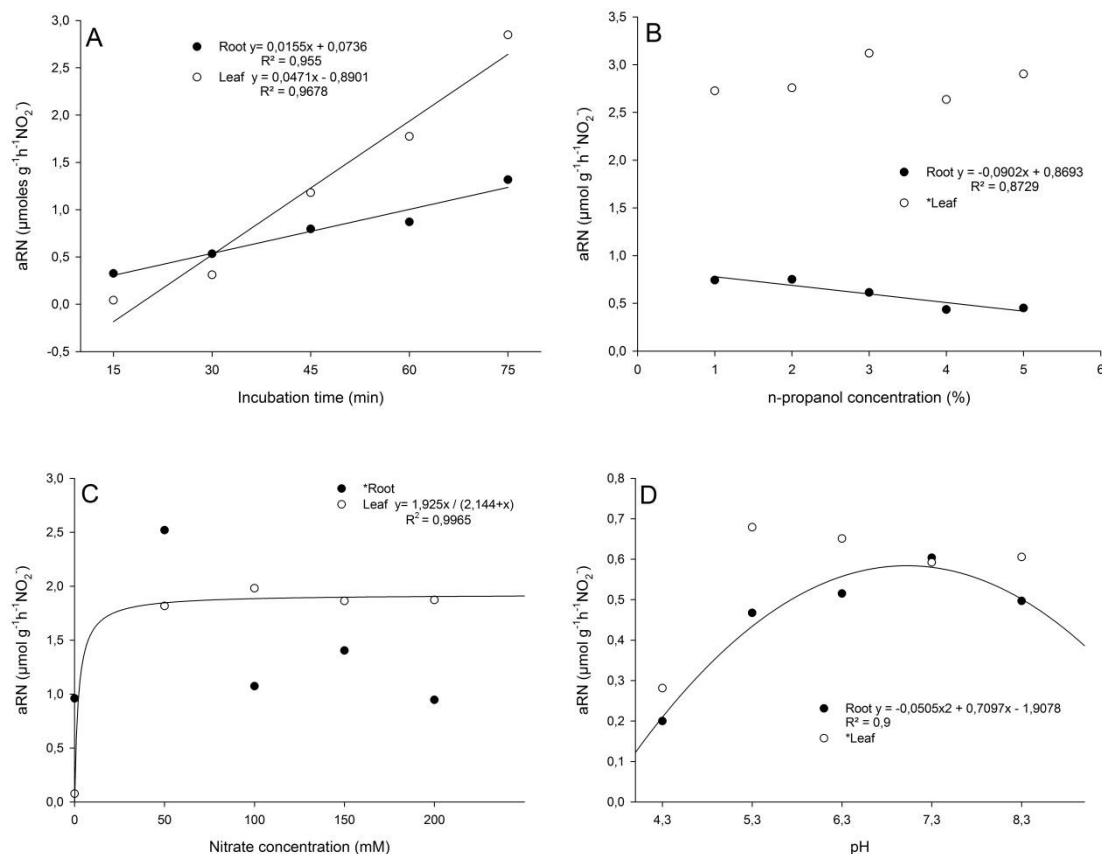


Figura 3. Atividade da RN em diferentes períodos de incubação (A), concentrações de n-propanol (B), concentrações de nitrato (C) e pH (D).

Efeito da adição de nitrato na atividade da RN

Os dados da atividade da RN foliar em relação ao fornecimento de nitrato foram ajustados para uma hipérbole retangular, modelo utilizado para descrever a cinética de saturação de um ligante ao seu substrato (Motulsky and Christopoulos, 2004). A atividade da enzima na folha foi observada quando fornecido o nitrato exógeno, sendo 50mM a concentração adotada para as análises posteriores por não haver diferença entre as concentrações maiores utilizadas (Figura 3C). Essa tendência de estabilização foi observada por outros autores para as folhas de cana-de-açúcar, braquiária e abacaxi (Santos et al., 2014; Cazetta and Villela, 2004; Nievola and Mercier, 2001) O aumento inicial da aRN em resposta a adição de nitrato ao meio

de incubação tem sido associado à síntese “de novo” da enzima, bem como à sua ativação (Solomonson and Barber 1990).

Diferentemente do observado para as folhas, no tecido radicular foi detectada atividade da RN expressiva mesmo sem a adição de KNO_3^- exógeno, indicando a existência de nitrato prontamente disponível acumulado nos vacúolos celulares (Dovis et al, 2014). No entanto, a adição de 50mM aumentou em mais de 100% a ação da enzima, e com a redução da atividade em concentrações acima dessa no meio de incubação (Figura 3C). A diminuição da aRN a partir de concentrações maiores ocorre, provavelmente, pelas alterações no equilíbrio de cargas iônicas geradas pela alta concentração de íons, pela redução do potencial osmótico (Cairo et al., 1994) e aumento da concentração salina no meio de reação (Meguro and Magalhães, 1982).

Efeito do pH na atividade da RN

Dentre a faixa de pH escolhida para o estudo, a menor atividade da RN foi em 4,3 para ambos os tecidos. O tecido radicular apresentou resposta quadrática com máxima estimada da aRN no pH 7, já para o tecido foliar, há uma faixa relativamente ampla de pH de alta atividade da enzima (Figura 3D). A maior atividade da enzima em pH próximo a neutralidade tem sido observada por outros autores em café (Meguro and Magalhães, 1982), cana-de-açúcar (Santos et al., 2014), pupunheira (Oliveira et al., 2005), abacaxi (Nievola and Mercier, 2001) e em braquiária (Cazetta and Villela, 2004), indicando que possivelmente essa é a faixa ótima de pH da enzima, na qual a sua atividade é máxima. O pH pode influenciar a atividade da enzima de formas distintas, alterando o padrão de cargas de um determinado sítio ativo, alterando a conformação geral da proteína (Nelson and Cox, 2014) ou modificando a velocidade de translocação de íons nitrato e nitrito através das membranas celulares (Oliveira et al., 2005).

Conclusão

A atividade da redutase do nitrato em tecido foliar de *Physalis angulata* deve ser avaliada após as primeiras quatro horas de luminosidade. Na raiz, a atividade pode ser avaliada em um maior período ao longo do dia, preferencialmente nos momentos de maior radiação solar e temperatura.

Para a avaliação da atividade da RN em *P. angulata*, recomenda-se o uso de n-propanol 1% e adição de 50 mM de KNO_3^- no meio de incubação, com o pH 7 do tampão fosfato. A incubação deve ser realizada em banho-maria por 75min para determinação da máxima atividade.

Referências

- Cairo PAR, Oliveira LEM, Delú Filho N (1994) Determinação das condições ótimas para o ensaio in vitro da redutase do nitrato em algumas espécies arbóreas. *Revista Árvore*. 18:87-95.
- Cazetta JO, Vilella LCV (2004) Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). *Sci. Agric*. 61(6):640-648.
- Cruz JL, Souza Filho LFS, Pelacani CR (2015) Influência da adubação fosfatada sobre o crescimento do camapu (*Physalis angulata* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 17(3):360-366.
- Curi PA, Carvalho CS, Salgado DL, Pio R, Silva DF, Pinheiro ACM, Souza VR (2018) Characterization of different native american physalis species and evaluation of their processing potential as jelly in combination with brie-type cheese. *Food Sci. Technol*. 38(1):112-119.
- Delú-Filho N, Oliveira LEM, Alves JD (1998) Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg): Otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. *Revista Árvore*. 21:329-336.
- Dovis VL, Hippler WR, Silva KI, Ribeiro RV, Machado EC, Mattos Jr D (2014) Optimization of the nitrate reductase activity assay for citrus trees. *Brazilian Journal of Botany*. 37(4):383-390.
- Ferreira DF (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*. 6:36-41.
- Crafts-Brandner SJ, Harper JE (1982) Nitrate reduction by roots of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) seedlings. *Plant Physiology*. 69:1928-1303.
- Jamur MC, Oliver C. (2010) Permeabilization of cell membranes. In: Oliver C, Jamur MC (Ed.). *Immunocytochemical methods and protocols*. 3rd edn. Totowa: Humana Press, 2010.
- Jaworski EG (1971) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 43:1274-1279.
- Kaiser WM, Huber SC (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiology relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* 52(363):1981-1989.

- Konishi M, Yanagisawa S (2011) The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA1, in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*. 52(5):824-836.
- Lea US, Leydecker MT, Quilleré I, Meyer C, Lillo C (2006) Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiology*. 140(1):1085-1094.
- Lee HJ, Titus JS (1992) Factors affecting the in vivo nitrate reductase assay from MM106 apple trees. *Communications of Soil Science and Plant Analysis*. 23:981-991.
- Leite RS, Tanan TT, Nascimento MN, Oliveira LM, Abreu PAS (2017) Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 47(2):145-151.
- Lillo C, Meyer C, Ruoff P (2001) The nitrate reductase circadian cycle system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiology*. 125:1554-1557.
- Lillo C, Meyer C, Lea US, Provan F, Oltedal S (2004) Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany* 55:1275-1282.
- Lorenzi H, Matos M (2008) *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. 2nd edn. Nova Odessa, SP: Plantarum, 512 p.
- Marin Sisley GM, Max Horna FY, Ríos Isern F, Aranda-Ventura J, Villacrés Vallejo J (2017) Actividad inmunoestimulante del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Physalis angulata* L. en ratas albinas cepa Holtzman. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 2(1):38-46.
- Martins AP, Chow F, Yokoya NS (2009) Ensaio in vitro da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Botânica*. 32(4):635-645.
- Matsumura AT (2012) Controle da atividade da reductase do nitrato em plantas de abacaxizeiro submetidas a baixas temperaturas em diferentes fases do ciclo diurno. (Master's Dissertation in Science – Botany) – Institute of Biosciences, University of São Paulo.
- Meguro NE, Magalhães AC (1982) Atividade da reductase de nitrato em cultivares de café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 17:249-257.

- Motulsky HJ, Christopoulos A (2004) Fitting models to biological data using linear and non-linear regression. A practical guide to curve fitting. In Oxford University Press, UK: Oxford University, 351p.
- Nelson DL, Cox MM (2014) Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6th edn. Porto Alegre: Artmed.
- Nievola CC, Mercier H (2001) Variações diurnas da atividade in vivo da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. - Bromeliaceae). *Revta brasil. Bot.* 24(3):295-301.
- Oliveira MAJ, Bovi MLA, Machado ECJ, Rodrigues JD (2005) Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). *Ciência Rural.* 35(3):515-522.
- Passos AI (2013) Adubação e assimilação de nitrogênio em duas espécies de fisális. (Master's Dissertation in Agronomy) – Federal Technological University of Paraná, Pato Branco.
- Queiroga RCF, Puiatti M, Fontes PCR, Cecon PR, Finger FL (2007) Influência de doses de nitrogênio na produtividade e qualidade do melão *Cantalupo* sob ambiente protegido. *Hortic. Bras.* 25(4):550-556.
- Queiroz CGS, Rena AB, Cordeiro AT, Alves JD (1993) Ritmo diurno na atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 28(7):787-795.
- Rajasekhar VK, Gowri G, Campbell WH (1988) Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. *Plant Physiology.* 88:242-244.
- Santos CLR, Cazetta JO, Saran LM, Sanches A (2014) Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 49(5):384-394.
- Singh VK (1994) Optimum conditions for measurement of nitrate reductase activity in the leaves of blast fibre yielding plants. *Proceedings Natural Academic Science India.* 64:389-398.
- Solomonson LP, Barber MJ (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology.* 41:225-253.
- Souza SR, Stark EMLM, Fernandes MS (2002) Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas. 1st edn. Rio de Janeiro: Artware Projetos Culturais. 55p.

Streeter JG, Bosler ME (1972) Comparison of in vitro and in vivo assays for nitrate reductase in soybeans leaves. *Plant Physiology*. 49:448- 450.

Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A (2017) *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*, 6th edn. Artmed, Porto Alegre.

Tanan TT, Nascimento MN, Passos AR, Leite RS, Guimarães DS (2013) Produção de biomassa de *Physalis angulata* L. cultivadas sob níveis crescentes de adubação. *Revista Magistra*. 25(esp):378-379.

Thomé M, Osaki F (2010) Adubação de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento de *Physalis* spp. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*. 8(1):11-18.

Tischner R (2000) Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment*. 21:1005-1024.

Tomassini TCB, Barbi NS, Ribeiro IM, Xavier DCD (2000) Gênero *Physalis*: uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova*. 23(1):47-57.

CAPÍTULO 3

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Physalis angulata* L. SOB DIFERENTES PROPORÇÕES E FONTES DE NITROGÊNIO³

³Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico científico Archives of Agronomy and Soil Science

Respostas fisiológicas de *Physalis angulata* L. sob diferentes proporções e fontes de nitrogênio

Tamara Torres Tanan^a, Alismário Leite da Silva^a, Uasley Caldas de Oliveira^b, Romeu da Silva Leite^a, Marilza Neves do Nascimento^a

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brazil; ^bCentro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brazil.

Resumo

As plantas absorvem o nitrogênio na forma de nitrato ou amônio, sendo a forma preferencial variável entre as espécies. Nesse estudo, nós avaliamos os efeitos do suprimento de nitrato e amônio em diferentes proporções no crescimento e desenvolvimento em *Physalis angulata*, bem como algumas respostas fisiológicas. Um esquema fatorial 5 x 5, em delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, composto por 5 proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100) na solução nutritiva e 5 períodos de avaliação (0, 7, 14, 21 e 28 dias após o transplântio). O fornecimento de grandes quantidades de amônio reduziu o comprimento do caule e da raiz, o número de ramificações e a expansão foliar. As plantas cultivadas com predomínio de amônio tiveram a floração e frutificação retardada, assim como redução no teor de clorofila. A atividade da redutase do nitrato ocorre em folhas e raízes, alterando o local de redução de acordo ao estágio de desenvolvimento da planta. Conclui-se que o amônio em altas taxas é tóxico para as plantas de *P. angulata*, que apresentam melhor desenvolvimento e maior crescimento quando cultivadas com as proporções de 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$.

Palavras-chaves: nitrato, amônio, redutase do nitrato, metabolismo do nitrogênio.

Abstract

Plants absorb nitrogen in the form of nitrate or ammonium, the preferred form being variable among species. In this study, we evaluated the effects of nitrate and ammonium supply in different ratios on growth and development in *Physalis angulata*, as well as some physiological

responses. The experiment was carried out according to a completely randomized design with factorial scheme 5 x 5, consisting of 5 proportions of NO_3^- : NH_4^+ (100: 0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0: 100) in the nutrient solution and 5 periods (0, 7, 14, 21 and 28 days after transplantation). The supply of high doses of ammonium reduced stem and root length, number of branches and leaf expansion. The plants cultivated with predominance of ammonium had the flowering and fruiting delayed, as well as reduction in the chlorophyll content. The activity of nitrate reductase occurs in leaves and roots, changing the site of reduction according to the stage of development of the plant. We conclude that ammonium at high rates is toxic for *P. angulata* plants, with better development and higher growth when grown with the proportions of 75:25 and 50:50 NO_3^- : NH_4^+ .

Keywords: nitrate, ammonium, nitrate reductase, nitrogen metabolism.

Introdução

O nitrogênio é um macronutriente essencial e o absorvido em maior quantidade pelos vegetais, sendo o suprimento inadequado um fator limitante para várias culturas (Bredemeier e Mundstock 2000). O N ocorre nos solos principalmente na forma nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+), e a preferência de absorção pelas plantas pode variar de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais (Britto e Kronzucker 2002).

A absorção do amônio ocorre de forma uniporte, por um processo passivo, estando prontamente disponível para incorporação em moléculas orgânicas sem a necessidade de gastos energéticos. Enquanto a absorção do nitrato, ocorre por via simporte, com transporte simultâneo de 2 H^+ e 1 NO_3^- para dentro da célula, havendo um custo de 2 moles de ATP para a absorção (Bredemeier e Mundstock 2000). A assimilação do nitrato é feita por meio da redução à nitrito pela ação da enzima redutase do nitrato (RN), que é a primeira e mais importante enzima deste processo, sua atividade depende, principalmente, da luz e do contínuo suprimento de nitrato (Kawachi et al. 2002). Posteriormente, o nitrito é reduzido a amônio, e esse é incorporado a compostos orgânicos pelas enzimas de assimilação do N, glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (Taiz e Zeiger 2014).

Apesar do maior custo energético para a absorção e redução do nitrato, grande parte das plantas absorvem preferencialmente a forma nítrica, já que em altas concentrações o amônio pode causar toxicidade. Entre os sintomas da toxicidade do amônio estão a supressão do crescimento, a clorose das folhas, a redução da absorção de outros cátions e o desacoplamento

da fotofosforilação (Kronzucker et al 2001; Britto and Kronzucker 2002; Hachiya et al. 2012). Além disso, a absorção de NH_4^+ leva ao efluxo de H^+ para fora da célula, acarretando na acidificação do meio (Helali et al. 2010; Silva et al. 2010).

O nível de tolerância ao amônio varia entre plantas. Espécies que se desenvolvem em solos ácidos normalmente absorvem o NH_4^+ , enquanto espécies de solos alcalinos ou calcários tem a preferência pelo NO_3^- (Bartelheimer and Poschlod 2014). Variações na tolerância ao amônio também podem ser observadas entre espécies relacionadas, por exemplo, as plantas da família Solanaceae são classificadas como sensíveis ao amônio (Brito and Kronzucker 2002), com relato de reduções no crescimento em tabaco (Lu et al. 2005), batata (Serio et al. 2004) e em tomate (Liu et al. 2017; Barreto et al. 2018).

Apesar da toxicidade do amônio, diversos autores relataram que a aplicação conjunta da forma nítrica e amoniacal promove melhor crescimento e produtividade em diversas espécies (Andriolo et al. 2006; Cruz et al. 2006; Hachiya et al. 2012; Guimarães et al. 2014). Para o cultivo do tomate hidropônico, o teor de amônio na solução deve estar entre 25 a 30% do N total (Sandoval-Villa et al. 2001). Em *Physalis peruviana* L. a aplicação da proporção 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ aumentou o diâmetro do caule e número de flores e frutos (Antunez-Ocampo et al. 2014, 2016).

A *Physalis angulata* L. é uma espécie pertencente à família Solanaceae que tem um grande potencial econômico, devido aos seus frutos com alto teor de vitamina C e atividade antioxidante (Oliveira et al.2011; Curi et al. 2017), e ao potencial medicinal atribuído à sua composição fitoquímica, que possui diversas propriedades farmacológicas, como atividade antiparasítica, antiviral e antineoplásica (Marin Sisley et al. 2017). Apesar do seu grande potencial, poucos são os estudos sobre o seu cultivo (Cruz et al., 2015; Vargas-Ponce et al., 2016; Leite et al. 2017; Tanan et al. 2018), e são inexistentes avaliações sobre o seu desenvolvimento sob diferentes fontes nitrogenadas aplicadas. Assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar o crescimento e o desenvolvimento de plantas de *P. angulata*, bem como quantificar o teor de clorofila e a atividade da redutase do nitrato das plantas submetidas a diferentes doses de nitrato e amônio em solução hidropônica.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, nos meses de novembro de 2017 a janeiro de 2018. Para obtenção das mudas, sementes de *P. angulata* foram colocadas para germinar em copos descartáveis contendo substrato comercial, em casa de vegetação sob irrigação de aspersão diária, em Feira de Santana, BA (12°14'21"537S e 38°58'46"W, altitude de 258 m), região de clima sub-úmido seco, segundo a classificação de Thornthwaite (Santos et al. 2018).

Quinze dias após a germinação, as plântulas foram selecionadas quanto a uniformidade da parte aérea e radicular e transplantadas para o sistema de plantio definitivo, que consistiu em um sistema hidropônico do tipo *floating*, no qual as plantas foram dispostas em vasos plásticos de 6 L contendo solução nutritiva, com uma planta por vaso, sendo ancoradas numa placa de isopor, colocada diretamente na superfície da solução de nutrientes contida no vaso. Cada vaso representou um sistema independente acoplado a um compressor com sistema regulador de tempo (temporizador) para a oxigenação da solução, com duração de 20 minutos programada para cada 3 horas.

A solução nutritiva de referência utilizada foi a de Sarruge, modificada para o cultivo de *P. angulata* (Leite et al. 2017), composta pelos seguintes nutrientes, em mg L⁻¹: N=162; P=31; K=234,6; Ca=200,4; Mg=48,6; S=64,1, em µg L⁻¹: B=500; Cu=39; Cl=722; Fe=5000; Mn= 502; Mo=12; Zn=98. Durante a condução do experimento, a condutividade elétrica foi monitorada periodicamente e a solução nutritiva trocada aos 25 dias de experimento, quando a condutividade reduziu em 30% comparada a inicial, e o pH da solução foi ajustado para 5,5. Para evitar o tombamento e quebra de galhos, foi utilizado o tutoramento em "X" conforme indicado por Muniz et al. (2011) para o cultivo de *Physalis*. Para a prevenção e controle de pragas, aplicações de extrato de Neen 5% (*Azadirachta indica*) foram realizadas semanalmente.

Desing experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 × 5, tendo como fatores as proporções de NO₃⁻ e NH₄⁺ e os períodos de avaliação, com doze repetições para os dados de crescimento e seis repetições para o teor de clorofila e a atividade da redutase do nitrato. Foram utilizadas cinco combinações de fontes nitrogenadas na solução nutritiva, com as seguintes proporções de NO₃⁻:NH₄⁺: T1 – 100:0; T2 – 75:25; T3 – 50:50; T4 – 25:75; T5 – 0:100, com as análises realizadas no dia do transplantio e com intervalos de 7 dias, totalizando cinco avaliações, ao longo de 28 dias de cultivo.

Análises de crescimento

O crescimento da planta foi avaliado a partir das medições do comprimento do caule (COMC) e o comprimento da raiz (COMR), utilizando trena milimetrada; do diâmetro do caule (DC), com uso de paquímetro digital; e da contagem manual do número de ramificações (NR). Para a biometria das folhas, utilizou-se o primeiro par de folhas de cada uma das plantas, na qual determinou-se o comprimento (COMF) e a largura (LARF) da folha, utilizando régua graduada, e a área foliar (ARF), mensurada com um medidor de área foliar (Li- Cor, modelo Li-3100C).

Conteúdo de clorofila

A extração da clorofila foi realizada utilizando álcool 95%, conforme recomendado para a *P. angulata* (Tanan et al. 2017), retirando-se discos foliares de área conhecida de 5 folhas do terço médio da planta. Os discos foram imediatamente imersos em tubos contendo o álcool 95% e envoltos com papel alumínio para exclusão da luminosidade. Após 24h, a absorbância foi medida em espectrofotômetro de feixe duplo (FEMTO 800XI) a 664 nm e 648 nm, e os teores de clorofila total (a+b) (CHL) calculados utilizando as equações propostas por Lichtenthaler (1987).

Atividade da Redutase do Nitrato (aNR)

A análise da atividade da redutase do nitrato (aRN) foi determinada em amostras de raiz e folha das plantas. O tecido radicular foi fragmentado em pedaços uniformes utilizando tesoura, e do tecido foliar foram retirados discos de 8 mm de diâmetro com auxílio de furador. O ensaio *in vivo* da atividade da RN foi realizado segundo metodologia proposta por Jaworski (1971), e a aRN estimada em μmol de nitrito liberado por 1 g de tecido fresco por hora de incubação ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}\text{NO}_2^-$).

Determinação das fases fenológicas

Para a determinação da ocorrência dos principais estádios fenológicos, quinze plantas por tratamento de *P. angulata* foram acompanhadas diariamente para a verificação do número de dias necessários para a ocorrência de botões florais, flores abertas e início da frutificação, considerados quando mais de 50% das plantas atingiam o referido estágio.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, e o fator quantitativo (tempo) foi analisado por meio de regressão utilizando o *software* SISVAR (Ferreira 2014).

Resultados

Efeito da proporção de nitrato e amônio no crescimento

Para os parâmetros comprimento do caule, diâmetro do caule, comprimento da raiz, número de ramificações, largura e comprimento da folha e área foliar ocorreu interação entre as fontes nitrogenadas e o tempo de cultivo, evidenciando que a aplicação de nitrato e amônio como fontes únicas ou combinadas influenciam no incremento dessas variáveis (Tabela 1).

Com a aplicação de 100, 75 e 50% do nitrogênio na forma nítrica, o comprimento do caule apresentou um padrão sigmóide, sendo possível identificar as fases logarítmica, linear e senescente, típicas do crescimento vegetal (Figura 2A). Quando o amônio foi fornecido em maior quantidade na solução ocorreu um lento incremento em altura, não sendo observada todas as fases. As diferenças no comprimento do caule foram visualmente perceptíveis a partir de 14 dias da aplicação dos tratamentos (Figura 1), no qual o uso da proporção 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ resultou no menor crescimento das plantas (Figura 2A). A partir dos 14 dias, o comprimento do caule foi superior nas plantas cultivadas com as proporções de 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (Figura 2A), com valores de 17 e 16,39 cm, respectivamente, aos 28 dias.

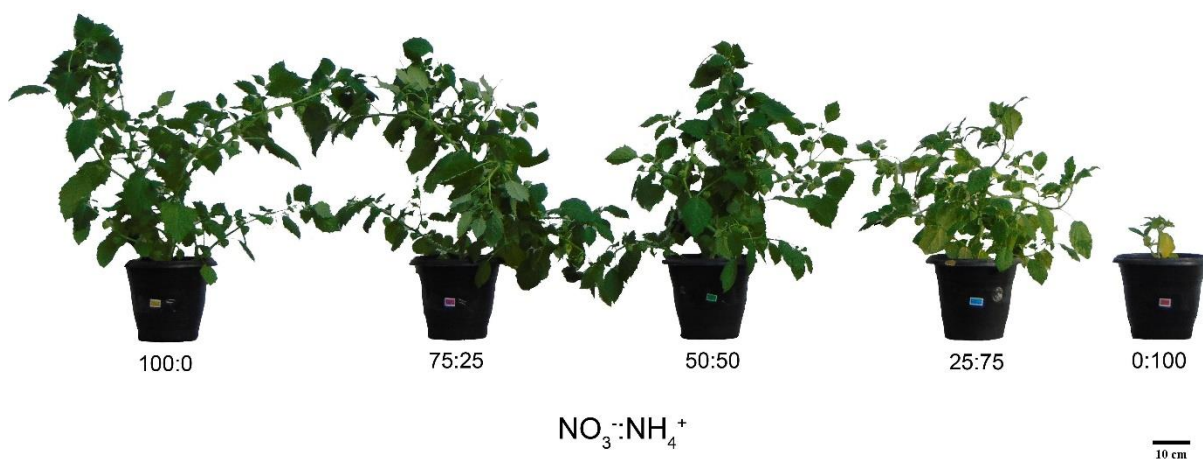


Figura 1. Fotografia das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas sob cinco proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Tabela 1. Resultados da análise de variância para as variáveis de crescimento avaliadas ao longo do desenvolvimento das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em sistema hidropônico sob diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios						
		COMC ¹	COMR	DIAC	NR	COMF	LARF	ARF
Tempo (T)	4	1.938,2**	4.599,7**	1.494,6**	26,80**	1.349,7**	526,05**	42.239,8**
Fonte de Nitrogênio (N)	4	266,6**	675,1**	217,2**	359,4**	168,4**	86,35**	9.673,6**
T X N	16	54,16**	236,1**	45,91**	19,68**	23,61**	15,57**	1.936,7**
Resíduo	275	13,22	57,1	2,36	0,74	2,39	1,45	78,4
CV (%)		49,02	26,77	25,45	67,16	20,95	24,17	21,12

¹CC = comprimento do caule; COMR = comprimento da raiz; DIAC = diâmetro do caule; NR = número de ramificações; COMF = comprimento da folha; LARF = largura da folha; ARF = área foliar.

**,*Significativo, pelo teste F, a 1% e 5% respectivamente. ^{ns}não significativo pelo teste F.

O uso do amônio como fonte única de nitrogênio reduziu consideravelmente o diâmetro do caule, resultado observado a partir de 7 dias da aplicação dos tratamentos. Após 28 dias, com a aplicação de 100% do nitrogênio na forma amoniacal, houve redução em média de 65% quando comparado aos valores obtidos com as proporções 100:0, 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (Figura 2B). Para as dosagens superiores a 50% de nitrogênio nítrico, não foram observadas diferenças no diâmetro do caule.

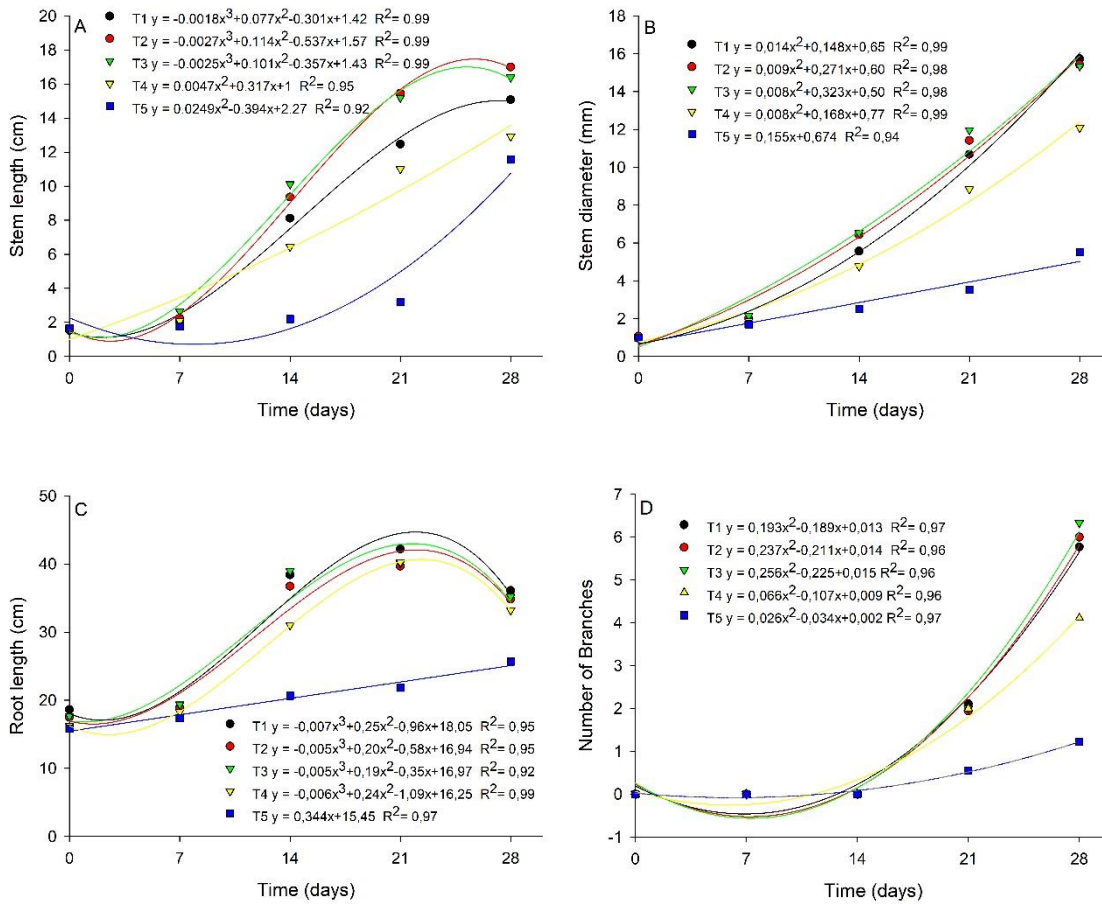


Figura 2. Comprimento da haste principal (A), diâmetro do caule (B), comprimento da raiz (C) e número de ramificações (D) de plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em sistema hidropônico sob diferentes proporções de nitrato e amônio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$)

O comprimento da raiz também foi afetado negativamente pela alta concentração de amônio, contudo, só houve redução e alteração no padrão de crescimento com a utilização de 100% do nitrogênio na forma amoniacal, no qual houve uma redução média de 22% a 29% comparado aos demais tratamentos (Figura 2C). Para as plantas cultivadas com aplicação de

75% de NH_4^+ não houve diferença em comparação aos tratamentos com predomínio da forma nítrica (Figura 2C).

Com relação ao número de folhas, foi observado que as ramificações surgiram somente após 21 dias da aplicação dos tratamentos para todas as proporções de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ utilizadas, exceto para o cultivo com a fonte única amoniacal (Figura 2D). Ao final de 28 dias, as plantas cultivadas com 100, 75 e 50% de nitrato na solução apresentaram a média de 6 ramificações, enquanto as plantas cultivadas com 75 e 100% de amônio continham 4 e 1 ramificação, respectivamente (Figura 1; 2D).

Apesar do padrão de crescimento da folha ter se mantido o mesmo para cada variável nas diferentes fontes nitrogenadas, os valores obtidos foram bem inferiores quando o cultivo ocorreu com o amônio como fonte única de nitrogênio (Figura 3). A redução na largura do 1º par de folha ocorreu a partir de 14 dias, quando fornecido somente NH_4^+ (Figura 3A). Nas plantas supridas com 75% do nitrogênio na forma amoniacal também houve diminuição na largura foliar, observada a partir de 21 dias da aplicação dos tratamentos. O fornecimento de 75:25 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ proporcionou a maior largura no primeiro par de folha (8,93 cm), não havendo diferença para o uso das proporções 100:0 e 50:50 (Figura 3A).

A diferença no comprimento do 1º par de folha com a aplicação das fontes nitrogenadas foi perceptível a partir de 14 dias, no qual o uso das doses de amônio superiores a 50% do nitrogênio total afetou negativamente (Figura 3A). Assim, como para a largura da folha, o comprimento foliar foi maior com o fornecimento de NO_3^- e NH_4^+ na proporção de 75:25 (13,20 cm), não havendo diferença para o fornecimento de 100:0 e 50:50 (Figura 3B). Quando comparado o uso do nitrato e do amônio como fontes únicas, o fornecimento de nitrato obteve melhor resultado, sendo 89% superior ao amônio.

Dentre os parâmetros que medem o tamanho da folha, a área foliar foi o que apresentou sintomas mais rapidamente. Após 7 dias do transplântio para a hidroponia, as plantas cultivadas com o fornecimento de 75% e 100% de amônio já apresentavam a área foliar bem inferior. Aos 28 dias, as plantas com fornecimento de nitrato e amônio na mesma proporção (50:50) obtiveram a maior área foliar (108,5 mm^2), um valor 338% maior que o das plantas cultivadas com o amônio como fonte única (22,23 mm^2) (Figura 3C).

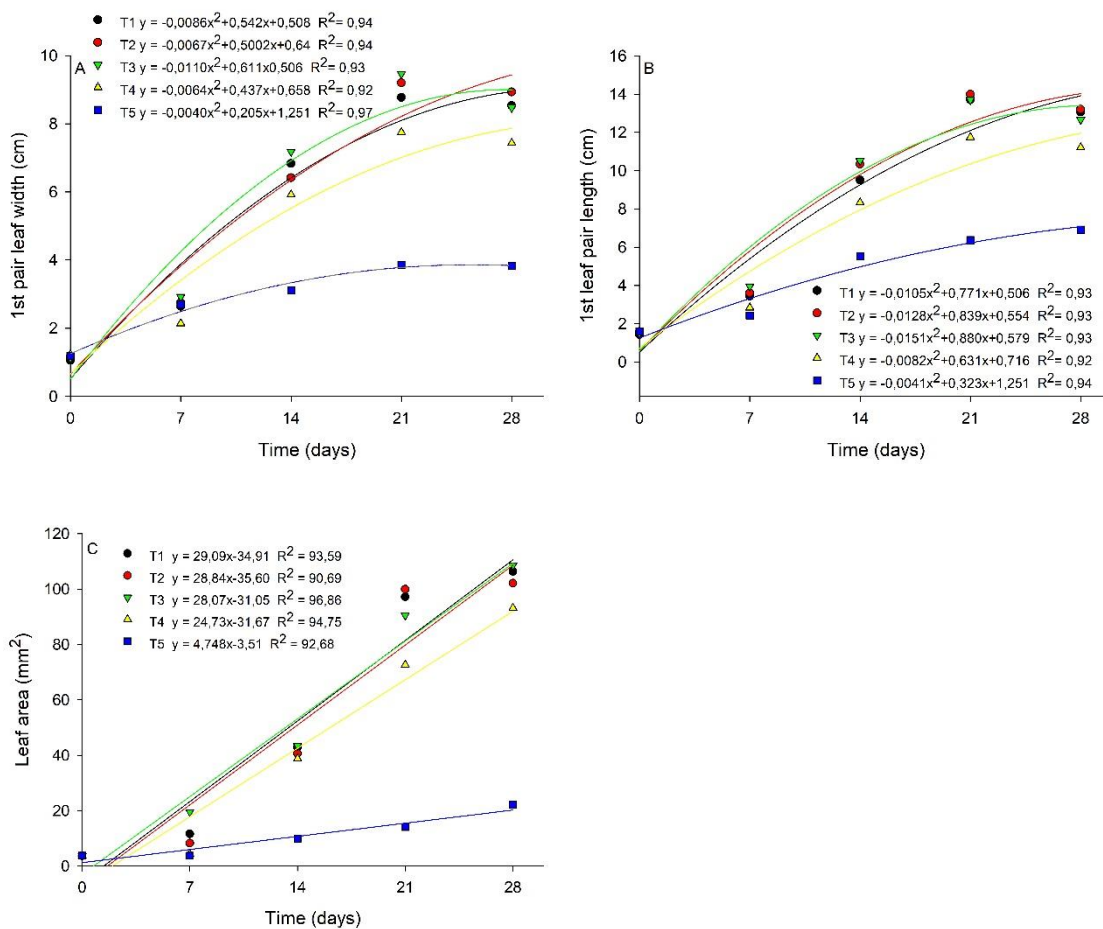


Figura 3. Largura (A), comprimento (B) e área (C) do primeiro par de folhas das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$)

Fases fenológicas

Nos cultivos com o uso das proporções 100:0, 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, as plantas não demonstraram diferenças no tempo necessário para a ocorrência dos estádios fenológicos (Figura 4). O surgimento dos botões florais ocorreu 14 dias após o transplântio (DAT) (29 dias de cultivo). Aos 21 DAT as plantas já apresentavam flores abertas e, aos 28 DAT (47 dias de cultivo), a produção de frutos teve início (Figura 4). A aplicação de 75% do N na forma amoniacal atrasou a ocorrência das fases fenológicas, e reduziu a duração da floração. Quando as plantas foram supridas somente com NH_4^+ , não alcançaram o estágio reprodutivo, apresentando apenas os órgãos vegetativos ao longo do cultivo (Figura 4).

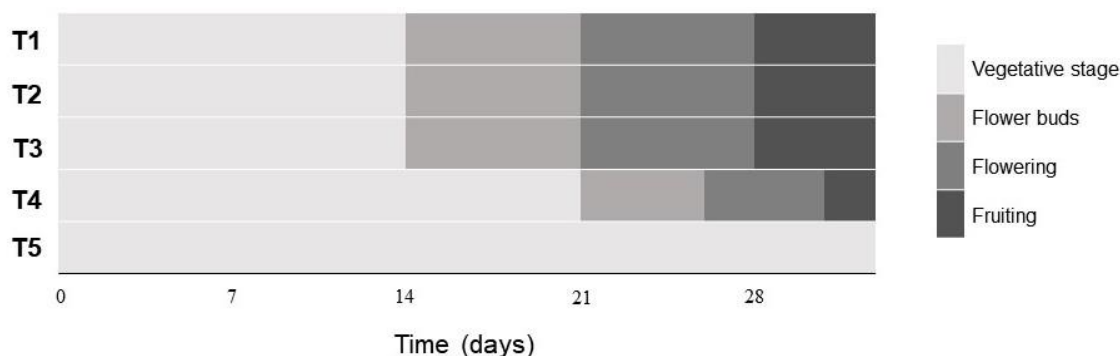


Figura 4. Crescimento vegetativo, ocorrência de botões florais, flores abertas e início da frutificação em plantas de *Physalis angulata* L. submetidas a diferentes concentrações de nitrato e amônio na solução nutritiva. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$).

Conteúdo de clorofila

O teor de clorofila total (a + b) foi influenciado pela fonte nitrogenada aplicada (Tabela 2). Os tratamentos com o uso das fontes de N combinadas seguiram um mesmo padrão ao longo do cultivo, sendo o teor máximo observado entre os 14 e 21 dias. O fornecimento de 100% do N total na forma nítrica ocasionou menor teor de clorofila comparado ao uso das fontes combinadas, apesar de apresentar o mesmo padrão quadrático (Figura 5). Aos 28 dias, o máximo conteúdo de clorofila foi obtido com a proporção 75:25 ($50,01 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) e o menor com 0:100 ($31,29 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), uma redução de 38% (Figura 5). O uso do NH_4^+ como fonte única de N para as plantas proporcionou um aumento no teor de clorofila em relação ao tempo, entretanto, com valores bem inferiores ao obtido para os demais tratamentos (Figura 5). Ademais, ocorreu clorose foliar nas plantas supridas somente com amônio, com folhas pequenas e amareladas (Figura 1).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para a clorofila total (CHL) e atividade da redutase do nitrato (aRN) avaliadas ao longo do desenvolvimento das plantas de *Physalis angulata* L. cultivadas em sistema hidropônico sob diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios		
		CHL	aRN	
			Foliar	Radicular
Tempo (T)	4	3.512,8**	110,59**	42,18**
Fonte de Nitrogênio (N)	4	1.101,0*	1,28*	4,55**
T X N	16	97,15**	1,34**	1,23**
Resíduo	125	25,19	0,49	0,28
CV (%)		12,88	21,18	39,69

**,*Significativo, pelo teste F, a 1% e 5% respectivamente. ^{ns}não significativo pelo teste F.

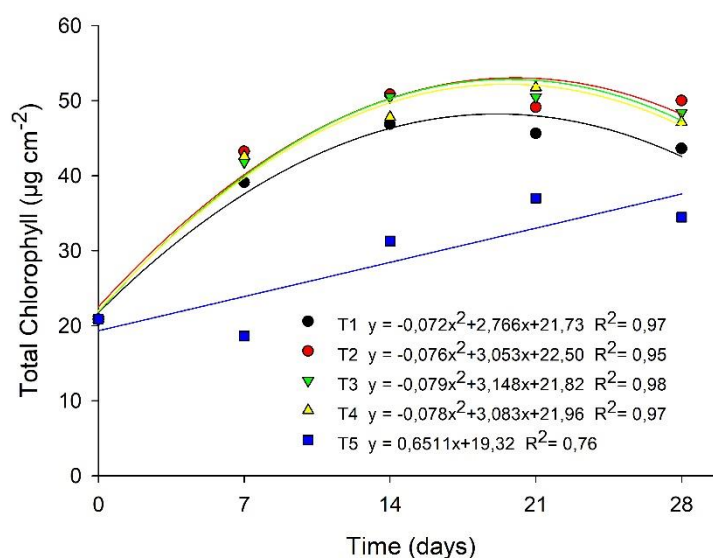


Figura 5. Teor de clorofila das folhas de *Physalis angulata* L. quando submetidas a proporções de nitrato e/ou amônio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de NO₃⁻:NH₄⁺).

Atividade da Redutase do Nitrato

A atividade da redutase do nitrato foi influenciada pelas fontes de nitrogênio aplicadas ao longo do cultivo (Tabela 2). Para todos os tratamentos, a redução do nitrato ocorreu, inicialmente, em maior quantidade, no tecido foliar. Por volta dos 14 DAT, tem início uma

diminuição na atividade da RN foliar, tornando, após os 21 DAT, a raiz o principal local de assimilação de NO_3^- em plantas cultivadas com ambas as fontes ou exclusivamente com N-nítrico (Figura 6). Apesar dessa redução na aRN foliar também ter ocorrido no tratamento com 100% de NH_4^+ , a folha ainda continuou apresentando uma atividade enzimática maior do que a raiz, mantendo-se como sítio principal de assimilação até os 28 DAT (Figura 6). Aos 28 DAT, o fornecimento de 75:25 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ resultou em menor atividade enzimática foliar ($0,45 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Figura 6A), entretanto, o mesmo obteve a maior aRN na raiz ($3,49 \mu\text{moles NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Figura 6B).

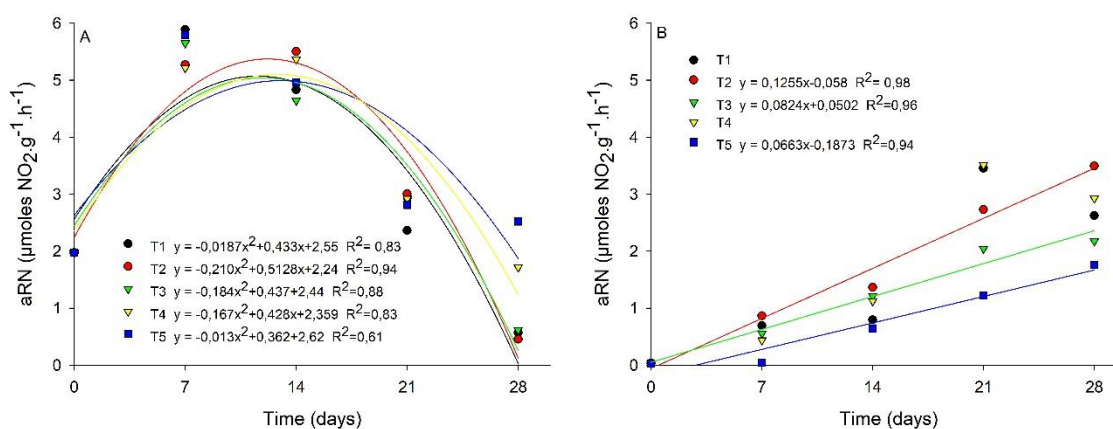


Figura 6. Atividade da Redutase do Nitrato foliar (A) e radicular (B) de *Physalis angulata* L. ao longo do desenvolvimento cultivadas com doses de nitrato e/ou amônio. (T1- 100:0, T2 – 75:25, T3 – 50:50, T4 – 25:75, T5 – 0:100 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$).

Discussão

Para um grande número de espécies, incluindo diversas solanáceas, o excesso de amônio na rizosfera é tóxico, apresentando como sintoma à supressão do crescimento (Britto e Kronzucker 2002). A toxicidade do amônio pode estar associada com diversos fatores, entre eles a redução na absorção de outros cátions como o Ca^+ , Mg^+ e K^+ , nutrientes essenciais para o crescimento da planta (Holzschuh et al. 2001; Britto e Kronzucker 2002). Em trabalhos anteriores, já foi constatado menor teor desses cátions no tecido vegetal quando supridos com altas doses de amônio (Helali et al. 2000; Holzschuh et al. 2001; Roosta e Schjoerring 2007). Em *Physalis peruviana*, a ausência de cálcio acarreta no menor desenvolvimento da raiz, redução no número de raízes laterais e também afeta o desenvolvimento de folhas jovens (Moschini et al. 2017), semelhante ao observado nesse trabalho com *P. angulata*, indicando que a toxicidade do NH_4^+ pode estar relacionada a redução na absorção de outros nutrientes.

O fornecimento de altas concentrações de NH_4^+ reduz a absorção de potássio, o que leva a sua exportação das folhas e reciclagem no floema (Lu et al. 2005). O íon K^+ tem um papel importante no estabelecimento do turgor celular, sua concentração nas células-guardas é responsável pelos mecanismos de abertura e fechamento estomático (Andrés et al. 2014), podendo reduzir a absorção de água pela planta. Apesar de não demonstrarem sinais de estresse hídrico, plantas de tabaco nutridas com altas concentrações de amônio tiveram a transpiração e a condutância estomáticas reduzidas (Lu et al. 2005), assim como em tomateiro, o NH_4^+ acarretou na redução na eficiência no uso da água (Lugert et al. 2001).

A manutenção do status hídrico da planta é necessária para a turgidez celular, mecanismo responsável pela expansão foliar. Quando o NH_4^+ limita a absorção de K^+ , principal íon de estabelecimento do turgor, é provável que reduções no tamanho da folha ocorram, como mostramos em *Physalis angulata*, e também observado por outros autores em roseira (Guo et al. 2011), mandioca (Cruz et al. 2006) e *Arabidopsis thaliana* (Helali et al. 2010). O NH_4^+ tem sido proposto como limitante à capacidade de retenção de água nas plantas, reduzindo a condutividade hídrica nas raízes e afetando a expansão foliar (Guo et al. 2002).

Outro efeito negativo da alta concentração de amônio, provavelmente relacionada à supressão da absorção do K^+ , é a redução nas trocas gasosas em plantas (Guo et al. 2011). O carbono que é incorporado em compostos orgânicos no ciclo de Calvin-Benson é oriundo do CO_2 atmosférico, e a sua aquisição ocorre através da abertura estomática. Desse modo, a nutrição amoniacal pode reduzir a taxa fotossintética e, conseqüentemente, a disponibilidade de carboidratos e ácidos orgânicos para o crescimento vegetal, como relatado em roseira (Guo et al. 2011) e *A. thaliana* (Hachiya et al. 2012). Por outro lado, muitos autores associam a redução no crescimento, em plantas supridas com amônio, ao alto consumo de ácidos orgânicos para a assimilação do NH_4^+ em excesso, afim de evitar o seu acúmulo nos tecidos. É conhecido que a nutrição amoniacal reduz os níveis teciduais de ácidos dicarboxilícos (não-aminos) e aumentam a concentração de aminoácidos nos tecidos (Britto e Kronzucker 2002). Já foi demonstrado em plantas de *A. thaliana* que o meio com amônio elevou o consumo de 2-oxoglutarato e o acúmulo de glutamina, levando ao desequilíbrio entre o metabolismo de aminoácidos e ácidos orgânicos (Hachiya et al. 2012).

A diminuição na quantidade de ácidos orgânicos nas plantas, seja pela redução da atividade fotossintética ou pelo alto consumo para incorporação do amônio, reduz a disponibilidade de esqueletos de carbono para o crescimento vegetal, ocasionando plantas com

menor altura, diâmetro do caule e comprimento da raiz. Apesar da taxa fotossintética não ter sido avaliada nesse trabalho, a redução na parte aérea e na raiz das plantas de *P. angulata* cultivadas somente com NH_4^+ na solução é um indicativo da utilização do carbono assimilado para outras atividades metabólicas em detrimento do acúmulo de massa seca ou da menor atividade fotossintética dessas plantas.

Uma hipótese inicialmente proposta por Britto et al. (2001) e investigada por seu grupo de pesquisa posteriormente (Szczerba et al. 2008; Coskun et al. 2013), diz que a toxicidade do amônio é resultado do alto custo energético do bombeamento de NH_4^+ para fora das células, quando submetidas a taxas altas, em espécies sensíveis ao NH_4^+ , ao que o autor denomina de ciclagem fútil. Segundo esses autores, 80% do NH_4^+ absorvido é bombeado para fora da célula através de um processo de alto custo energético, o que aumenta a respiração nas raízes e, conseqüentemente, reduz o seu crescimento. Em *P. angulata*, a redução no crescimento da raiz foi bem acentuado quando supridas com N-amoniacal, assim como em *Panicum maximum* (Andrade et al. 2001), no tabaco (Lu et al. 2005), e no amendoim (Ribeiro et al. 2012), apesar de em nenhum dos casos ser conhecida a taxa de efluxo de NH_4^+ .

Apesar da existência de um mecanismo de efluxo de NH_4^+ , esse em altas concentrações na solução pode acumular-se nos tecidos acarretando diversas respostas no vegetal. Barker (1999) demonstrou que a evolução do etileno no tecido foliar aumentou linearmente com o acúmulo de NH_4^+ . Sabe-se que o etileno é um inibidor da divisão celular, podendo reduzir o crescimento de caule, pecíolos e a expansão foliar (Lee e Reid 1997; Pierik et al. 2006), além disso atua na senescência de flores e folhas (Davies 2010), sendo os eventos iniciais da senescência foliar a deterioração dos cloroplastos e o catabolismo da clorofila (Taiz e Zeiger 2014). Não sabemos ao certo se em plantas de *P. angulata* ocorreu evolução do etileno com o fornecimento de alta concentração de NH_4^+ , entretanto, observamos um menor teor de clorofila, clorose foliar e menor expansão foliar, assim como observado por Helali et al. (2010) em *A. thaliana*.

A maioria dos efeitos da toxicidade do amônio são, frequentemente, relacionados a alterações no pH do meio externo. A absorção do NH_4^+ ocorre por via uniporte, mediado por um transportador, aumentando assim as cargas positivas no citoplasma das células, gerando um desequilíbrio eletrostático entre o meio intra e extracelular, o que promove um efluxo de H^+ , acarretando na acidificação fora da célula (Bredemeier e Mundstock 2000). Essa acidificação da solução leva a faixa de indisponibilidade de alguns nutrientes essenciais como nitrogênio,

fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Silva et al. 2010), influenciando no metabolismo da planta, como já citado anteriormente. Já, a absorção do nitrato ocorre por via simporte, com o transporte simultâneo de 2 H⁺, levando a alcalinização do meio externo (Bredemeier e Mundstock 2000). Assim, o fornecimento simultâneo de nitrato e amônio pode contribuir para manutenção do pH da solução, já que a alcalinização da rizosfera pela absorção do NO₃⁻ pode limitar a acidificação causada pela absorção do NH₄⁺ (Britto e Kronzucker 2002), e dessa forma atenuar os efeitos da toxicidade.

A proporção de nitrato: amônio que deve ser empregada no cultivo depende da espécie. Para a alface recomenda-se o limite de 9 a 12% de NH₄⁺ no N total (Andriolo et al. 2006), já para o tomate, Sandoval-Villa et al. (2001) propõem que a concentração do amônio no cultivo hidropônico deve estar entre 25 e 30% do nitrogênio total. Em *P. angulata*, a faixa de tolerância ao amônio parece ser maior, já que a aplicação de 50% do N na forma amoniacal não afetou o crescimento da parte aérea e raiz, a expansão foliar, nem o teor de clorofila.

Além de atenuar a exigência do balanceamento de cargas no citosol e as alterações no pH, o fornecimento do nitrato e amônio combinados pode favorecer o crescimento da planta, aumentando em 40 a 70% quando comparado a fontes únicas, o que pode estar relacionado a maximização da citocinina (Britto e Kronzucker 2002). As concentrações de citocininas ativas em folhas e xilema são reduzidas quando as plantas são nutridas somente com NH₄⁺, e o alívio dos sintomas da toxicidade do amônio dependente do NO₃⁻, o que pode estar relacionado a uma regulação positiva nitrato/citocinina ainda não bem conhecida (Rahayu et al. 2005; Hachiya et al. 2012). Como as citocininas atuam na divisão celular e no crescimento de gemas laterais (Davies 2010), é de se esperar que plantas cultivadas com as duas fontes nitrogenadas apresentem maior crescimento e ramificação, como visto nesse experimento. Ademais, as citocininas promovem a conversão de etioplastos em cloroplastos e também podem melhorar a abertura estomática em algumas espécies (Davies 2010), acarretando em maior atividade fotossintética e consequente disponibilidade de esqueletos de carbono para incorporação do amônio, e assim evitar a sua toxicidade.

O efluxo de nitrogênio através da ciclagem fútil do NH₄⁺ também é reduzido quando as plantas são supridas com as fontes nitrogenadas combinadas, fazendo com que a absorção de nitrogênio, nesse caso, seja até 75% superior do que com a aplicação do amônio ou nitrato de forma isolada (Britto e Kronzucker 2002). Em *A. thaliana*, o baixo acúmulo de nitrogênio em plantas cultivadas em meio só com NH₄⁺, comparado às fontes combinadas, sugere que a

deficiência no nitrogênio pode ser o fator limitante ao crescimento (Helali et al. 2010). Não avaliamos o teor de nitrogênio total nesse experimento, entretanto, plantas de *P. angulata* cultivadas com baixo teor de nitrogênio na solução hidropônica tiveram a área foliar, a altura da parte aérea e o diâmetro do caule reduzidos, bem como menor teor de N total em folhas e caule (Leite et al. 2017).

Apesar do mecanismo de redução da toxicidade do NH_4^+ dependente de NO_3^- não ser totalmente compreendido, esse experimento mostrou que em *P. angulata* a aplicação conjunta das fontes nitrogenadas promove maior crescimento das plantas, desenvolvimento foliar, teor de clorofila, e não retardou o início do estágio reprodutivo, sendo mais eficiente que a aplicação das fontes isoladas.

A quantidade de nitrogênio absorvida varia durante o ciclo de desenvolvimento da planta, aumentando progressivamente durante a fase vegetativa, atingindo seu ápice durante os estádios reprodutivos, reduzindo posteriormente (Bredemeier e Mundstock 2000). Inicialmente, durante o rápido crescimento vegetativo, grande parte do N absorvido é transportado para as folhas, onde ocorre a redução e assimilação para a síntese de clorofila, rubisco e demais proteínas foliares (Bredemeier e Mundstock 2000). Assim, a maior atividade da RN foliar observada em *P. angulata* durante os primeiros 14 DAT deve estar relacionada ao rápido suprimento de nitrogênio para o desenvolvimento do maquinário fotossintético nas folhas. Por outro lado, durante o estágio reprodutivo ocorre a remobilização do nitrogênio foliar para o desenvolvimento das flores e frutos. A maior quantidade de aminoácidos, oriundos da degradação de proteínas foliares, atuam como reguladores, diminuindo a atividade da RN, provavelmente pela inibição da ação dos transportadores de NO_3^- na membrana (Imsande e Touraine 1994). Assim, com a aRN foliar reduzida, a maior parte do NO_3^- absorvido é reduzido pela RN radicular. Ademais, a redução no teor de clorofila em folhas de *P. angulata* teve início juntamente com o evento de floração, indicando a remobilização do N para os novos drenos. Entretanto, para as plantas supridas somente com o amônio, essa relação entre a produção de flores e frutos e a diminuição da aRN e do teor de clorofila não foram observados, já que essas plantas não alcançaram o estágio reprodutivo.

Os dados da atividade da RN em plantas quando supridas com nitrato e/ou amônio não são concisos. Guimarães et al. (2014) observaram a redução da aRN em eucaliptos supridos exclusivamente com amônio, entretanto, o uso de nitrato somente e a combinação das fontes de N não diferiram. Já, Andrade et al. (2001) obtiveram maior aRN com o uso de 50:50 de NO_3^-

:NH₄⁺ em capim colonião, sugerindo um efeito estimulador do amônio na atividade da RN na presença de nitrato, enquanto Helali et al. (2010), em *A. thaliana*, não observaram diferenças na atividade dessa enzima quando as plantas foram cultivadas em proporções de NO₃⁻:NH₄⁺. Na *P. angulata*, quando analisados os tecidos foliar e radicular separadamente, percebemos diferenças na aRN em diferentes proporções de NO₃⁻:NH₄⁺, entretanto, essas diferenças parecem estar mais associadas ao estágio fenológico da planta do que a forma nitrogenada empregada, já que ao analisar a aRN total da planta, em ambos os tecidos, não houve diferença na atividade enzimática.

Conclusão

Os resultados desse estudo mostraram que a *Physalis angulata* é uma espécie sensível ao uso exclusivo do amônio como fonte de N na solução nutritiva, apresentando sintomas de toxicidade como supressão do crescimento e expansão foliar, e redução no teor de clorofila. Ademais, a elevada concentração de amônio prejudicou o desenvolvimento da planta, retardando a floração e a frutificação quando em predomínio na solução. Por fim, recomenda-se para o cultivo de *P. angulata* o suprimento de nitrogênio nas proporções de 75:25 ou 50:50 de NO₃⁻:NH₄⁺ pois promovem melhor crescimento e desenvolvimento das plantas.

Referências

- Andrade SEM, Sant'Anna R, Cambraia J, Mosquim PR. Efeito da proporção NH₄⁺/NO₃⁻ na distribuição de nitrato e na atividade in vitro da redutase do nitrato em plantas de *Panicum maximum* [Effect of the NH₄⁺ / NO₃⁻ ratio on nitrate distribution and in vitro activity of nitrate reductase in *Panicum maximum* plants]. 2001. Planaltina (BR): Embrapa Cerrados. Portuguese.
- Andriolo JL, Godoi RS, Cogo CM, Bortolotto OC, Luz GL, Madaloz JC. 2006. Growth and development of lettuce plants at high NH₄⁺:NO₃⁻ ratios in the nutrient solution. Horticulture Bras. 24(3):352-355.
- Andrés Z, Pérez-Hormaeche J, Leide EO, Schlücking K, Steinhorst L, McLachlan DH, Schumacher K, Hetherington AM, Kudla J, Cubero B et al. 2010. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(17):1806-1814.

- Antúñez-Ocampo OM, Sandoval-Villa M, Alcántar-González G, Solís-Martínez M. 2014. Aplicación de amonio y nitrato en plantas de *Physalis peruviana* L [Ammonium and nitrate application on *Physalis peruviana* L. plants]. *Agrociencia*. 48:805-817. Spanish.
- Antúñez-Ocampo OM, Sandoval-Villa M, Alcántar-González G, Alvarado-López J, Sabino-López, JE. 2016. Floración y fructificación de *Physalis peruviana* L. por la aplicación de amonio y nitrato, edad y vigor de la planta [Flowering and fructification of *Physalis peruviana* L. by ammonium and nitrate application, vigor and plant age]. *Agrociencia*. 50:603-615. Spanish.
- Barker AV. 1999. Ammonium accumulation and ethylene evolution by tomato infected with root-knot nematode and grown under different regimes of plant nutrition. *Comm Soil Sci Plant Anal*. 30: 175–182.
- Barreto RF, Cruz FJR, Gaion LA, Prado RM, Carvalho RF. 2018. Accompanying ions of ammonium sources and nitrate: ammonium ratios in tomato plants. *J Plant Nutr Soil Sci*. 181(3):382-387.
- Bartelheimer M, Poschlod P. 2014. The response of grassland species to nitrate versus ammonium coincides with their pH optima. *J Veg Sci*. 25:760-770.
- Bredemeier C, Mundstock CM. 2000. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas [Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants]. *Ciênc. Rural*. 30(2):365-372. Portuguese.
- Britto DT, Siddiqi Y, Glass AD, Kronzucker HJ. 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(7):4255-4258.
- Britto DT, Kronzucker, HJ. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol*. 156:567-584.
- Coskun D, Britto DT, Li M, Becker A. Kronzucker HJ. 2013. Rapid ammonia gas transport accounts for futile transmembrane cycling under $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ toxicity in plant roots. *Plant Physiol*. 163:1859-1867.
- Cruz JL, Pelacani CR, Araújo WL. 2006. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca [Effect of nitrate and ammonium on growth and efficiency of nitrogen use by cassava plants]. *Bragatia*. 65(3):467-475. Portuguese.

- Cruz JL, Souza Filho LFS, Pelacani CR. 2015. Influência da adubação fosfatada sobre o crescimento do camapu (*Physalis angulata* L.) [Influence of phosphorus fertilization over the growth of the camapu (*Physalis angulata* L.)]. Rev Bras Pl Med. 17(3):360-366.
- Curi PN, Carvalho CS, Salgado DL, Pio R, Pasqual M, Souza FBM, Souza VR. 2017. Influence of different types of sugars in physalis jellies. Food Sci Technol. 37(3):349-355.
- Davies PJ. 2010. Plant Hormones: Biosynthesis, signal transduction, action. 3rd revised edition. New York: Springer.
- Ferreira DF. 2014. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciênc Agrotec. 38(2):109-112.
- Guimarães MMC, Cairo PAR, Neves OSC. 2014. Crescimento de *Eucalyptus urophylla* em meio hidropônico com diferentes proporções de nitrato e amônio [Growth of *Eucalyptus urophylla* in hydroponic médium with different ratios of nitrate and ammonium]. Floresta Ambient. 21(1):52-61. Portuguese.
- Guo S, Bruck H, Sattelmacher B. 2002. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. Plant Soil. 239:267-275.
- Guo X-R, Zu Y-G, Tang Z-H. 2011. Physiological responses of *Catharanthus roseus* to different nitrogen forms. Acta Physiol Plant. 34:589-598.
- Hachiya Y, Watanabe CK, Fujimoto M, Ishikawa T, Takahara K, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Uesono Y, Terashima I, Noguchi K. 2012. Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. Plant Cell Physiol. 53(3):577-591.
- Helali SM, Nebli, H, Kaddour R, Mahmoudi H, Lachaâl M, Ouerghi Z. 2010. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil. 336:65-74.
- Holzschuh MJ, Bohnen H, Anghinoni I, Pizzolato TM, Carmona FC, Carlos FS. 2011. Absorção de nutrientes e crescimento do arroz com suprimento combinado de amônio e nitrato [Nutrient absorption and rice growth under ammonium and nitrate combined supply]. R Bras Ci Solo. 35:1357-1366. Portuguese.
- Imsande J, Touraine B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiol. 105(1):3-7.

- Jaworski EG. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 43:1274-1279.
- Kawachi T, Shoji Y, Sugimoto T, Oji Y, Kleinhofs A, Warner RL, Ohtake N, Ohyama T, Sueyoshi K. 2002. Role of xylem sap nitrate in the regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *J Soil Sci Plant Nutr.* 48(1):79-85.
- Kronzucker HJ, Britto DT, Davenport RJ, Tester M. 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends Plant Sci.* 6(8):335-337.
- Lee SH, Reid DM. 1997. The role of endogenous ethylene in the expansion of *Helianthus annuus* leaves. *Can J Bot.* 75:501-508.
- Leite RS, Tanan TT, Nascimento MN, Oliveira LM, Abreu PAS. 2017. Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. *Pesqui Agropecu Trop* 47(2):145-151.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Liu G, Du Q, Li J. 2017. Interactive effects of nitrate-ammonium ratios and temperatures on growth, photosynthesis, and nitrogen metabolism of tomato seedlings. *Scientia Horticulturae.* 214:41-50.
- Lu YX, Li CJ, Zhang FS. 2005. Transpiration, potassium uptake and flow in tobacco as affected by nitrogen forms and nutrient levels. *Ann Bot.* 95:991-998.
- Lugert I, Gerendas J, Bruech H, Sattelmacher B. 2001. Influence of Nform on growth and water status of tomato plants. In: Horst WJ, SchenkMK, Buerkert A, et al., eds. Food security and sustainability of agroecosystems through basic and applied research. Dordrecht: Kluwer,306–307.
- Marin Sisley GM, Max Horna FY, Ríos Isern F, Aranda-Ventura J, Vallejo JV. 2017. Actividad inmunoestimulante del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Physalis angulata* L. en ratas albinas cepa Holtzman [Immunoestimulant activity of *Physalis angulata* L whole plant-lyophilized aqueous extract in albino Holtzman rats]. *Rev Peru Med Integrativa.* 2(1):38-46. Spanish.

- Moschini BP, Coelho VAT, Peche PM, Souza FBM, Coutinho G, Barbosa CMA, Freire AI. 2017. Crescimento e diagnose de deficiências nutricionais em *Physalis peruviana* L. [Nutritional deficiency and growth of *Physalis peruviana* L.]. *Agrotec*. 38(4):169-176.
- Muniz J, Kretzschmar AA, Rufato L, Pelizza TR, Marchi T, Duarte AE, Lima APF, Garanhani F. 2011. Sistemas de condução para o cultivo de *Physalis* no planalto catarinense [Conduction systems for *Physalis* production in southern Brazil]. *Rev Bras Frutic*. 33(3):830-838. Portuguese.
- Oliveira JAR, Martins LHS, Vasconcelos MAM, Pena RS, Carvalho AV. 2011. Caracterização física, físico-química e potencial tecnológico de frutos de camapu (*Physalis angulata* L.) [Physical, physico-chemical and technological potential of camapu fruits (*Physalis angulata* L.)]. *R Bras Tecnol Agroindustr*. 5(2):573-583. Portuguese.
- Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voeseek LACJ. 2006. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci*. 11(4):176-183.
- Rahayu YS, Walch-Liu P, Neumann G, Römheld V, von Wirén N, Bangerth F. 2005. Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻-induced stimulation of leaf growth. *J Exp Bot*. 56:1143–1152.
- Ribeiro MO, Boechat CL, Conceição MGS, Moreira FM, Ribeiro LO, Santos AR. 2012. Efeito das interações entre os íons amônio e nitrato na fisiologia do crescimento do amendoim [Effect of interactions between ammonium and nitrate on the growth physiology of groundnut]. *Rev Ceres*. 59(5):630-635. Portuguese.
- Roosta HR, Schjoerring JK. 2007. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. *J Plant Nutr*. 30:1933–1951.
- Sandoval-Villa M, Guertal EA, Wood CW. 2001. Greenhouse tomato response to low ammonium-nitrogen concentrations and duration of ammonium-nitrogen supply. *J Plant Nutr*. 24(11):1787-1798.
- Santos RA, Martins DL, Santos RL. 2018. Balanço hídrico e classificação climática de Thornthwaite em Feira de Santana Bahia [Water balance and Köppen climate classification and Thornthwaite in the municipality of Feira de Santana (BA)]. *Geo UERJ*. 33(2):in press.
- Serio F, Elia A, Signore A, Santamaria P. 2004. Influence of nitrogen form on yield and nitrate content of subirrigated early potato. *J Sci Food Agric*. 84:1428-1432.

- Silva PCC, Couto JL, Santos AR. 2010. Efeito dos íons amônio e nitrato no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva [Effect of nitrate and ammonium ions on the development of sunflower in nutrient solution]. Rev FZVA. 17(1):104-114. Portuguese.
- Szczerba MW, Britto DT, Balkos KD, Kronzucker HJ. 2008. Alleviation of rapid, futile ammonium cycling at the plasma membrane by potassium reveals K⁺-sensitive and -insensitive components of NH₄⁺ transport. J Exp Bot. 59(2):303-313.
- Taiz L, Zeiger E. 2014. Plant Physiology and Development. 6th revised edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 782 p.
- Tanan TT, Nascimento MN, Leite RS, Guimarães DS. 2017. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in *Physalis angulata* L. leaves using different methodologies. J Agr Sci. 9(11):117-122.
- Tanan TT, Nascimento MN, Leite RS. 2018. Produção e caracterização dos frutos de espécies de *Physalis* cultivadas no semiárido baiano [Yield and characterization of *Physalis* fruits cultivated in semiarid of Bahia – Brazil]. Colloq Agrariae. 14(3):113-121.
- Vargas-Ponce O, Martínez JS, Tavares MPZ, Mares LEV. 2016. Traditional management of a small-scale crop of *Physalis angulata* in Western Mexico. Genet Resour Crop Evol. 63(8):1383-1395.

CAPÍTULO 4

EFEITO DE FONTES NITROGENADAS NAS CARACTERÍSTICAS DOS FRUTOS E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Physalis angulata* L.⁴

⁴“Effect of nitrogen sources on fruit characteristics and seed physiological quality of *Physalis angulata* L.”. Artigo publicado em Pesquisa Agropecuária Tropical, vol. 49, e55074, 2019.

Efeito de fontes nitrogenadas nas características dos frutos e qualidade fisiológica de sementes de *Physalis angulata* L.

Tamara Torres Tanan¹, Alismário da Silva Leite¹, Uasley Caldas de Oliveira², Lourival Gonçalves Neto¹, Marilza Neve do Nascimento¹

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Feira de Santana, BA, Brasil.

²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Brasil.

Resumo:

A escolha da fonte nitrogenada adequada é de suma importância pois afeta o desenvolvimento da planta e a produção de frutos e sementes. Popularmente conhecida como mullaca, camapu e juá-de-capote, *Physalis angulata* L. é conhecida pelo seu uso medicinal e pelo seu alto valor nutricional. Deste modo, esse trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade dos frutos e de sementes de *P. angulata* obtidos de plantas cultivadas em sistema hidropônico, sob diferentes concentrações de nitrato e amônio. Os tratamentos consistiram de quatro proporções de NO_3^- : NH_4^+ (100:0, 75:25, 50:50, 25:75). Ao final do cultivo os frutos foram coletados para realização de análises biométricas, químicas e para a retirada de sementes para realização do ensaio de germinação. O teste de germinação foi conduzido em câmara de germinação e os parâmetros avaliados foram a porcentagem de germinação, tempo médio, velocidade, coeficiente de uniformidade da germinação e frequência relativa. Os frutos de menor massa e diâmetro foram obtidos com doses acima de 50% de amônio, entretanto, houve aumento no °Brix, e na relação SST/ATT. Essa dosagem também reduziu a porcentagem, velocidade e uniformidade da germinação. A utilização combinada das fontes nitrogenadas (50:50 de NO_3^- : NH_4^+) é aconselhável pois produz frutos maiores, mais doces e com sementes vigorosas.

Palavras-chave: camapu, nitrato, amônio, germinação.

Abstract:

In planting, it is of utmost importance to choose an appropriate nitrogen source since it affects plant development, and fruit and seed yield. Popularly called balloon cherry, wild tomato, camapu, among other names, *Physalis angulata* L. is known for its medicinal use and its high nutritive value. This study aimed to evaluate the quality of *P. angulata* fruits and seeds obtained from plants grown in a hydroponic system under different concentrations of nitrate and ammonium. Treatments consisted of four ratios of $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (100:0, 75:25, 50:50, 25:75). After full grown, the fruits were collected for biometric and chemical analyses, and seeds were removed for the germination test. The germination test was conducted in a germination chamber and the parameters evaluated were germination rate, mean germination time, speed, germination uniformity coefficient, and relative frequency. Fruits with lower weight and diameter were obtained at doses above 50% of ammonium; however, there was an increase in °Brix and in the SS/TT ratio. Such dosage also reduced the rate, speed and uniformity of germination. The combined use of nitrogenous sources (50:50 of $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) is recommended because it produces larger, sweeter fruits with vigorous seeds.

Keywords: camapu, nitrate, ammonium, germination.

Introdução

O gênero *Physalis* tem destaque principalmente pelo potencial medicinal das suas espécies, contudo, seus frutos, caracterizados pela presença de um cálice inflado que o envolve (Tomassini et al. 2000), tem alto valor nutricional e são comercializados em alguns países. No Brasil, destaca-se o plantio e consumo dos frutos de *Physalis peruviana* que podem ser utilizados na fabricação de doces, geleias, sucos, sorvetes e iogurtes, no consumo in natura e na produção de docinhos sofisticados para festas. No entanto, no norte e nordeste do Brasil tem destaque a *Physalis angulata* L., espécie de ocorrência natural (Matos 2000), que surge como alternativa para a região.

A *P. angulata* é uma planta herbácea de aproximadamente 70 cm de altura, conhecida popularmente como mullaca, camapú e juá-de-capote (Freitas et al. 2006). Seus frutos, uma baga globosa com numerosas sementes, tem sabor adocicado e levemente ácido, com alto teor de vitaminas, fósforo, ferro, flavonoides e fibras (Rufato et al. 2008, Velasquez et al. 2007). Apesar desse grande potencial, a espécie é pouco explorada, e poucas pesquisas são realizadas

sobre o seu cultivo, sobretudo referente as técnicas para aumentar a produtividade e a qualidade dos frutos.

A fertilização do solo está diretamente relacionada à produtividade das culturas, sendo o nitrogênio o macronutriente mais requerido pelas plantas, pois influencia na fotossíntese, na repartição de fotoassimilados entre a parte reprodutiva e vegetativa, no desenvolvimento celular e na composição de importantes biomoléculas (Queiroga et al. 2007). Trabalhos relacionados à fertilização em *P. angulata* demonstraram que o incremento da adubação NPK resultou na redução da massa dos frutos e aumento nas perdas de frutos (Thomé et al. 2010) e, em cultivo hidropônico, Leite et al. (2017) observaram um aumento da produção de frutos da espécie com maiores dosagens de N na solução nutritiva.

Um importante desafio no cultivo de frutíferas é aumentar a produção sem interferir na qualidade final do produto. Assim, é necessário não só adequar a dosagem dos fertilizantes utilizados, mas determinar a melhor fonte de nutrientes para cada espécie cultivada. As plantas geralmente mostram diferentes respostas em sua fisiologia e crescimento quando submetidas a diferentes fontes de N. A preferência por nitrato ou amônio varia em função das espécies, que no geral está relacionada às características genéticas e as condições ambientais (Majerowicz et al. 2000). As plantas supridas com N-amoniaco gastam menos ATP para cada N assimilado, porém, em excesso pode causar problemas de toxidez (Kronzucker et al. 2001).

Em plantas de *P. angulata*, a influência da fonte nitrogenada, sobretudo na qualidade dos frutos, não foi investigada. Entretanto, em plantas de tomate a aplicação combinada de NO_3^- e NH_4^+ reduz o rendimento de frutos associado ao aumento na qualidade, com frutos com maior teor de sólidos solúveis totais, maior acidez e menor pH (Flores et al. 2003). Ademais, é sabido que plantas que se desenvolvem em condições nutricionais adequadas tem maior potencial para produção de sementes bem formadas e vigorosas (Alves et al. 2005). Com a demanda crescente por sementes de alta qualidade, cresce também a necessidade de estabelecer as fontes nutricionais mais adequadas para produção das mesmas.

Diante do exposto, objetivou-se estimar o efeito de distintas concentrações de nitrato e amônio na qualidade dos frutos e de sementes de *P. angulata* obtidos de plantas cultivadas em solução nutritiva.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no município de Feira de Santana – BA, na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (12°14'21"537S e

38°58'46"W, a uma altitude de 258 metros), região de clima sub-úmido seco, segundo a classificação de Thornthwaite (Santos et al. 2018), em estufa de crescimento vegetal com cobertura plástica transparente, de novembro de 2017 a março de 2018.

A semeadura foi realizada em copos descartáveis de polipropileno, com capacidade para 200mL, contendo substrato comercial, utilizando duas sementes por copo. Após a germinação e quando as mudas apresentavam dois pares de folhas verdadeiras com aproximadamente 10 cm, foi realizado o transplante para sistema hidropônico do tipo leito flutuante. A solução nutritiva de referência utilizada foi a de Sarruge, modificada para o cultivo de *P. angulata* (Leite et al. 2017), composta pelos seguintes macronutrientes, em mg L⁻¹: N=162; P=31; K=234,6; Ca=200,4; Mg=48,6; S=64,1. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 5 repetições, compostas de uma planta cada. Os tratamentos consistiram em diferentes combinações de fontes nitrogenadas na solução nutritiva, com quatro proporções de NO₃⁻:NH₄⁺ (T1 – 100:0; T2 – 75:25; T3 – 50:50; T4 – 25:75).

Foram utilizados vasos com 6 L de capacidade, contendo 1 planta por vaso. Durante o cultivo, o pH da solução nutritiva foi mantido entre 5,5 e 6,5, e a condutividade elétrica foi monitorada periodicamente, sendo a solução trocada quando a condutividade reduzia em 25% quando comparada à inicial.

Após 73 dias do início do cultivo, 50 frutos por tratamento completamente desenvolvidos foram coletados manualmente e aleatoriamente, em diversas posições nas plantas, e levados ao laboratório onde foram realizadas as análises. As características físicas avaliadas foram: peso fresco do fruto (PF) e peso de sementes por frutos (PSF), ambos determinados com uso de balança analítica de precisão; coloração dos frutos, mediante comparação com a carta de cores RHS (The Royal Horticultural Society 2001); diâmetro transversal (DT) (medida da região mediana) e diâmetro longitudinal (DL) (medida do ápice à base), usando paquímetro digital. Posteriormente, calculou-se a relação DL/DT para indicar o formato dos frutos.

As características químicas avaliadas foram: teor de sólidos solúveis totais (SS), expresso em °Brix, determinado com refratômetro digital com correção de temperatura para 20°C; acidez total titulável (TA), por titulometria com solução de NaOH 0,1N, conforme metodologia proposta por Moretti et al. (1998). Posteriormente, calculou-se a relação SST/ATT.

As sementes foram retiradas manualmente sob água corrente até a separação completa da polpa e colocadas para secar em temperatura ambiente por 48 horas. A análise da viabilidade

da semente foi realizada por meio de teste de germinação, utilizando-se quatro subamostras de 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com 2 folhas de papel germitest, umedecidas com água destilada. Os ensaios foram conduzidos em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura alternada de 20-30°C. A contagem das sementes germinadas foi realizada diariamente por um período de 21 dias, sendo consideradas germinadas as sementes que emitiram a radícula. Com os dados obtidos foi calculada a porcentagem de germinação (%G), o tempo médio de germinação (TMG), a velocidade de germinação (V) e a frequência relativa (FR).

As médias dos dados obtidos foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo os dados de % da coloração dos frutos e %G transformados por arcoseno da raiz quadrada de X sobre 100 para as análises estatísticas, entretanto foram apresentados nas tabelas os valores sem transformação. Os dados foram submetidos a análise de variância com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do *software* SISVAR (Ferreira 2014).

Resultados e Discussão

A utilização de diferentes concentrações de nitrato e amônio no cultivo de *P. angulata* refletiu na qualidade dos seus frutos. No que concerne à caracterização física, observa-se um efeito negativo do uso do nitrogênio na forma amoniacal acima de 50% na solução nutritiva, promovendo redução no peso dos frutos e nos diâmetros transversais e longitudinais (Figura 1-A,B,C).

Os frutos com maiores pesos (1,89 g) foram obtidos de plantas cultivadas utilizando somente o NO_3^- , entretanto, não houve diferença significativa para o cultivo com 50% de nitrato e 50% de amônio. Quando na solução hidropônica prevalecia o uso de amônio, o peso médio dos frutos foi 1,07 g (Figura 1-A). Resultado similar foi observado por Flores et al. (2003), no qual o incremento de amônio reduziu o peso dos frutos de tomate, sendo o maior valor obtido com a adição exclusivamente da forma nítrica. Por outro lado, Antúnez-Ocampo et al. (2014) não observaram diferença no peso dos frutos de *Physalis peruviana* com o uso de diferentes proporções de nitrato e amônio, entretanto, não foram avaliadas doses superiores a 50% de NH_4^+ .

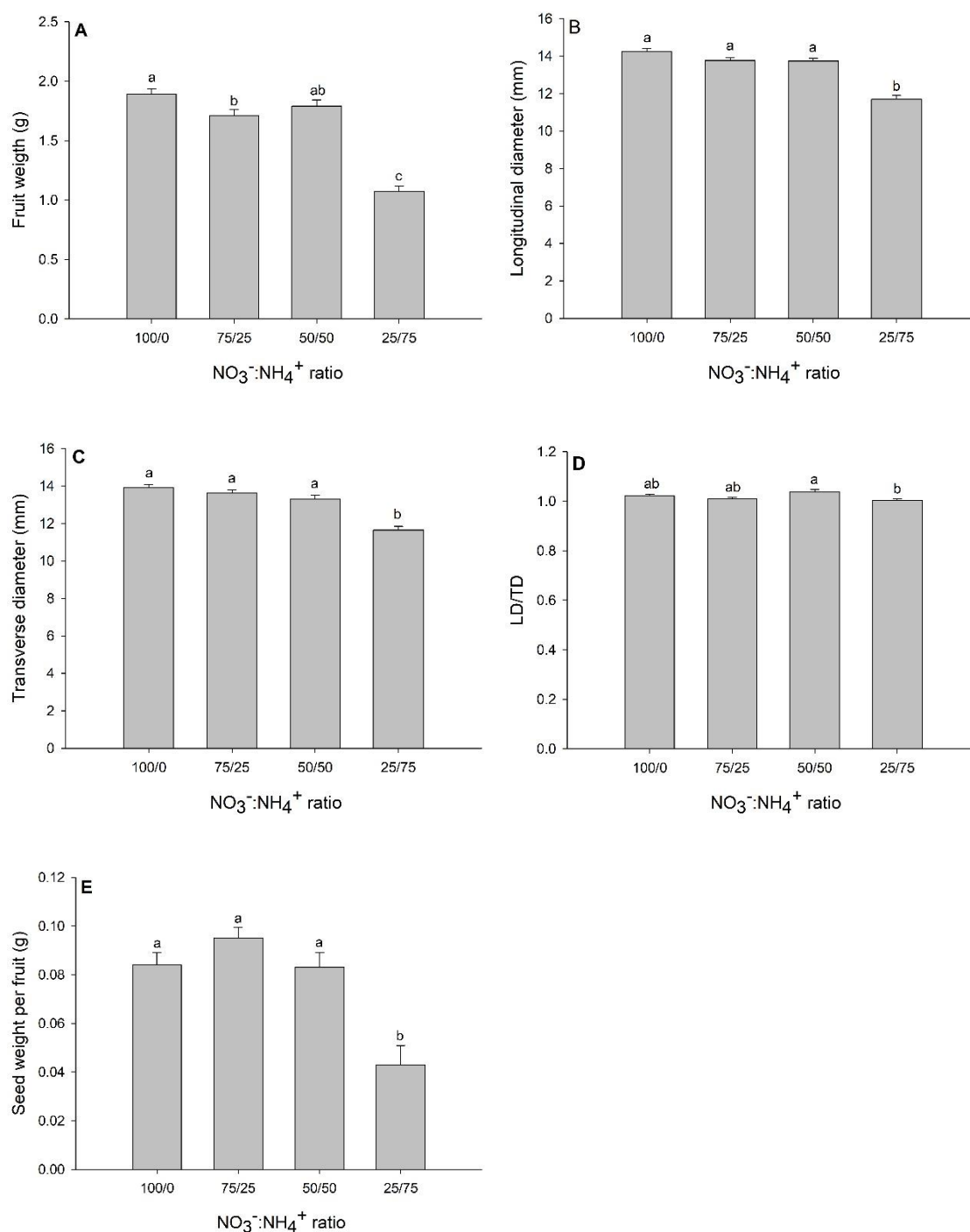


Figura 1. Características físicas dos frutos de *Physalis angulata* coletados de plantas cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas. A – peso do fruto (PF); B – diâmetro transversal (DT); C – diâmetro longitudinal (DL); D – Relação DL/DT; E - peso de sementes por frutos (PSF). *Letras distintas nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Do mesmo modo, os menores valores observados para os diâmetros longitudinal e transversal, 11,69 e 11,65 mm, respectivamente, foram com a proporção 25:75 NO₃⁻:NH₄⁺, que

também acarretou na menor relação DL/DT (Figura 1-B,C,D). O diâmetro longitudinal e transversal quando analisados em conjunto definem o formato do fruto, sendo mais redondo quanto mais próximo for de 1 (Gerhardt et al. 1997). Assim, apesar da redução na relação DL/DT, o formato do fruto não alterou quando utilizada as diferentes fontes nitrogenadas, pois manteve-se próximo a 1, sendo considerados como globular ovais.

Resultado semelhante foi observado por Rivera-Espejel et al. (2014) para o tomate, que obtiveram frutos com o menor diâmetro longitudinal e transversal quando aplicada somente a forma amoniacal e os maiores valores com o uso das formas combinadas, não ultrapassando 50% de amônio. Diferente do descrito por Sokri et al. (2014), que não observaram diferença no DL, DT, na relação DL/DT e no peso de maçãs cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas, corroborando o fato da sensibilidade ao amônio variar entre as espécies. Brito & Kronzucker (2002) classificam a família Solanaceae como sensível ao NH_4^+ , demonstrando sintomas de toxidez, como severa redução no crescimento.

O uso em maior proporção do amônio na solução hidropônica também reduziu o peso médio de sementes por fruto. Nos tratamentos com 100:0, 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, o PSF obtido foi de 0,084, 0,095 e 0,083 g, respectivamente, já no tratamento com 25:75 o peso foi de 0,043 g (Figura 1E). Ribeiro et al. (2002) verificaram uma correlação entre o tamanho do fruto e a produção de sementes de tomate, no qual os frutos maiores produziam maior massa de sementes, corroborando o observado nesse trabalho.

Em relação a caracterização química dos frutos, também houve influência da fonte nitrogenada utilizada. O teor de sólidos solúveis totais foi maior nos tratamentos com 50:50 e 25:75 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, com 12,18 e 12,63 ° Brix, respectivamente, indicando que a maior disponibilidade de amônio na solução favorece o acúmulo de SS (Figura 2A). Resultados semelhantes foram obtidos por Flores et al. (2003) e Rivera-Espejel et al. (2014) para o tomate e por Antunez-Ocampo et al. (2014) para a *P. peruviana*.

O amônio tende a reduzir a absorção de cátions pela competição por sítios de absorção (Assunção et al. 2018), diminuindo a concentração de cálcio, magnésio e potássio (Serna et al. 1992). O K é essencial para o aumento de SS, e a utilização do NH_4^+ na solução reduziu a sua concentração em plantas de maçã e arroz (Holzschuh et al. 2011; Sokri et al. 2014). Martinez et al. (2008) observaram que um dos sintomas da deficiência em K nas plantas de *P. peruviana* foi a redução de 13,6% no teor de SS.

A ação antagonista entre o NH_4^+ e outros cátions também pode estar relacionada ao aumento na acidez dos frutos (Sokri et al., 2014). Para os frutos de *P. angulata* o maior valor de ATT foi com o uso da proporção 75:25 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, não havendo diferença entre os cultivos com o uso de apenas uma fonte nitrogenada na solução (Figura 2B). A acidez é de fundamental importância para a industrialização, pois confere maior dificuldade de deterioração por microrganismos e permite maior flexibilidade na adição de açúcar (Morgado et al., 2010).

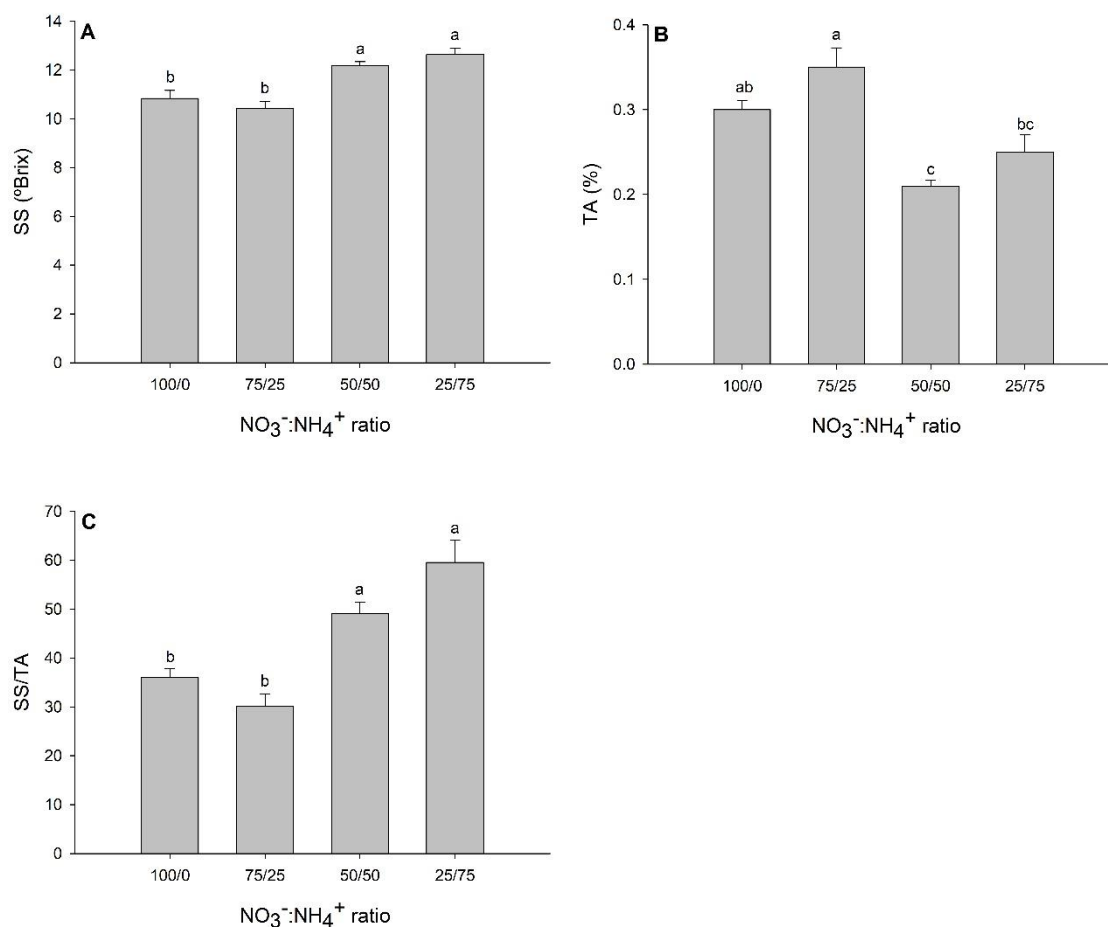


Figura 2. Caracterização química dos frutos de *Physalis angulata* coletados de plantas cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio. A – Sólidos solúveis (SS); B - Acidez total titulável (ATT); C - Relação SS/ATT. *Letras distintas nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Mais representativa que a medição das variáveis isoladas, a relação SS/ATT é importante pois propicia uma boa avaliação do sabor dos frutos. O uso das diferentes proporções de nitrato e amônio influenciou essa relação, com o maior valor de 59,51 obtido com o uso de 25:75 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, não diferindo do cultivo com 50:50 (Figura 2C). Segundo Reis et al. (2015), alto conteúdo de SS e a baixa ATT indicam uma elevada relação SS/ATT, o

que significa forte predominância do sabor doce em frutos. Deste modo, o cultivo com proporções mais altas de amônio contribui para a produção de frutos mais adocicados em *P. angulata*.

A fonte nitrogenada utilizada também influenciou na coloração dos frutos, sendo observada uma maior quantidade de frutos da cor verde escura no cultivo com 25:75 de NO_3^- : NH_4^+ (Tabela 1). Segundo Galvis et al. (2005), a alteração na coloração dos frutos de *Physalis* é um indicador da maturação, mudando da coloração verde intensa para o amarelo como consequência da degradação da clorofila (Castañeda & Paredes 2003). Deste modo, a maior porcentagem de frutos verde escuros observada com o uso de 75% de amônio na solução indica que esses ainda não atingiram o estágio de maturação. Ben-Oliel et al. (2004) observaram que o amônio prolongou o período para o desenvolvimento dos frutos de tomate e atrasou a colheita em uma semana.

O grau de maturidade do fruto no momento da colheita pode influenciar na qualidade fisiológica da semente, o que foi observado com a menor taxa de germinação obtida no tratamento com 25:75 de NO_3^- : NH_4^+ . As sementes extraídas dos frutos de plantas cultivadas com até 50% de amônio na solução apresentaram alta %G, superior a 95% (Tabela 2), considerada por Pérez Camanho et al. (2008) como um nível aceitável para o comércio de sementes.

Tabela 1. Coloração dos frutos de *Physalis angulata* coletados de plantas cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio.

Coloração do fruto (%)	Proporção NO_3^- : NH_4^+			
	100:0	75:25	50:50	25:75
Amarelo esverdeado	88a	64b	94a	60b
Verde	8b	36a	6b	0b
Verde escuro	4b	0b	0b	40a

*Letras distintas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A redução observada no uso de 25:75 de NO_3^- : NH_4^+ pode estar relacionada à competição do NH_4^+ e outros cátions por sítios de absorção, como por exemplo o Ca_2^+ , que tem sua absorção

e conseqüentemente teor na planta reduzido em altas concentrações de amônio (Serna et al. 1992). O cálcio está positivamente relacionado a germinação, atuando na manutenção da integridade das membranas celulares o que aparentemente confere maior qualidade fisiológica à semente (Peske et al. 2003). Entretanto, Oliveira et al. (2003) obtiveram resultado diferente para o feijão, no qual o cultivo com sulfato de amônio proporcionou maior %G do que o nitrato de potássio, porém eles avaliaram sementes oriundas de cultivo em campo e não em sistema hidropônico.

Além de reduzir a %G, o uso da forma amoniacal como predominante na solução nutritiva aumentou o tempo médio de germinação. Para as proporções 100:0, 75:25 e 50:50 o tempo médio foi de 3,6, 3,0 e 3,2 dias, muito próximo ao descrito por Souza et al. (2017), que relataram tempo médio de 3,8 dias para a espécie. A maior velocidade de germinação foi observada nos tratamentos 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, indicando que a aplicação conjunta das formas nitrogenadas, não excedendo 50% de amônio durante o cultivo, gerou sementes mais vigorosas (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de germinação (%G), tempo médio (TMG) e velocidade média (V) da germinação de sementes dos frutos de *Physalis angulata* oriundos de cultivos com diferentes fontes de nitrogênio.

	Proporção $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$			
	100:0	75:25	50:50	25:75
G (%)	99.0a	99.5a	100a	86.0b
TMG (dias ⁻¹)	3.60b	3.06b	3.27b	4.78a
V (dias ⁻¹)	0.27b	0.32a	0.30ab	0.21c

*Letras distintas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Muitos fatores estão envolvidos na composição e vigor de sementes, sendo o vigor a soma de todas as propriedades que determinam o potencial para uma rápida e uniforme emergência e desenvolvimento de plântulas normais (Marco Filho 2015). A maior uniformidade da germinação foi observada nos tratamentos 100:0, 75:25 e 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, como pode ser observado nos polígonos de frequência relativa (Figura 2), que com a aplicação

dessas proporções foram unimodais, diferente do tratamento com 75% de amônio que foi polimodal.

A partir da fecundação, o óvulo evolui sofrendo modificações que, como resultado final, origina a semente madura, com máximo tamanho, peso seco e vigor (Peske et al., 2003). Isso ocorre devido ao acúmulo de fotoassimilados na semente, deste modo, alterações no aparato fotossintético podem influenciar na sua formação. Lewis et al. (1989) sugerem que o efeito negativo do NH_4^+ tem sido atribuído à necessidade de utilização dos carboidratos prioritariamente para a rápida assimilação do amônio absorvido, devido a sua toxicidade, em detrimento as demais atividades da planta, como observado por Silva et al. (2018), no qual as plantas de *P. angulata* reduziram o incremento em massa seca sob altas doses de NH_4^+ . Desse modo, a redução na disponibilidade de carbono para síntese de reservas da semente pode comprometer a sua germinabilidade e vigor.

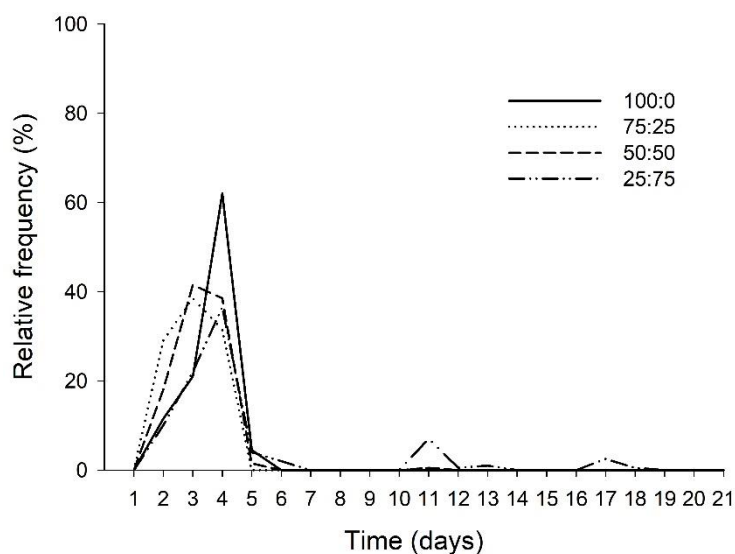


Figura 3. Frequência relativa de germinação de sementes de *Physalis angulata* coletadas de frutos oriundos de cultivos em diferentes proporções de nitrato e amônio.

Ademais, os resultados obtidos parecem indicar que o predomínio de amônio na solução nutritiva leva ao desequilíbrio iônico, comprometendo a absorção de outros cátions essenciais para a planta refletindo em frutos de coloração mais verde, menores e com sementes com menor taxa de germinação e vigor. Diversos autores observaram o melhor desenvolvimento das plantas e qualidade de frutos e grãos com o uso da combinação das duas fontes nitrogenadas (Antunez-Ocampo et al., 2014; Ben-Oliel et al., 2004; Holzschuh et al., 2011; Marinho et al., 2001;

Rivera-Espejel et al., 2014; Sun et al., 2014), corroborando o observado nesse trabalho para a *P. angulata*.

Conclusões

Altas concentrações de amônio na solução nutritiva compromete o tamanho dos frutos, porém aumenta a relação SST/ATT.

A utilização combinada das fontes nitrogenadas (50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) é aconselhável pois produz frutos maiores, mais doces e com sementes vigorosas.

Referências

ALVES, E. U. et al. Rendimento e qualidade fisiológica de sementes de coentro cultivado com adubação orgânica e mineral. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 27, n. 1, p.132-137, 2005.

ANTÚNEZ-OCAMPO, O. M. et al. Aplicación de amônio y nitrato em plantas de *Physalis peruviana* L. *Agrociencia*, v. 48, p. 805-817, 2014.

ASSUNÇÃO, N. S. et al. Nutritional quality of tomatoes as a function of nitrogen sources and doses. *African Journal of Agricultural Research*, v. 13, n. 19, p. 996-1000, 2018.

BEM-OLIEL, G. et al. Effects of Ammonium to Nitrate Ratio and Salinity on Yield and Fruit Quality of Large and Small Tomato Fruit Hybrids. *Journal of Plant Nutrition*, v. 27, n. 10, p. 1795-1812, 2004.

BRITO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, v. 159, p. 567-584, 2002.

CASTAÑEDA, G.E.; PAREDES, R.I. *Estudio del proceso respiratorio, principales ácidos orgánicos, azúcares y algunos cambios físico-químicos en desarrollo del fruto de uchuva (Physalis peruviana L.)*. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 92p. 2003.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

- FLORES, P. et al. Tomato yield and quality as affected by nitrogen source and salinity. *Agronomie*, v. 23, n. 3, p. 249-256, 2003.
- FREITAS, T. A.; RODRIGUES, A. C. C.; OSUNA, J. T. A. Cultivation of *Physalis angulata* L. and *Anadenanthera colubrina* [(Vell.) Brenan] species of the Brazilian semi-arid. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n. esp., p. 201-204, 2006.
- GALVIS, J.A.; FISCHER, G.; GORDILLO, M. Cosecha e poscosecha de la uchuva. In: *Producción, poscosecha y exportación de la uchuva Physalis peruviana L.* Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Asociación Hortifrutícola de Colombia. p.165-188, 2005.
- GERHARDT, L.B.A. et al. Características físico-químicas dos frutos de quatro cultivares e três clones de goiabeira em Porto Lucena, RS. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, n.2, p.185-192, 1997.
- HOLZSCHUH, M. J. et al. Absorção de nutrientes e crescimento do arroz com suprimento combinado de amônio e nitrato. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 35, p. 1357-1366, 2011.
- KRONZUCKER, H.J. et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends in Plant Science*, v. 6, p.335-337, 2001.
- LEWIS, O.A.M. et al. Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytologist*, v.111, p.155-160, 1989.
- LEITE, R. S. et al. Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 47, n.2, p. 145-151, 2017.
- MAJEROWICZ, N. et al. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environmental and Experimental Botany*, v.44, p.195-206, 2000.

- MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015.
- MARINHO, C. S. et al. Doses de nitrogênio e a qualidade dos frutos do mamoeiro. *Scientia Agrícola*, v. 58, n. 2, p. 345-348, 2001.
- MARTÍNEZ, F. E. et al. Efecto de la deficiencia de N, P, K, Ca, Mg y B en componentes de producción y calidad de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Agronomia Colombiana*, v. 26, n. 3, p. 389-398, 2008.
- MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. 2 ed. Fortaleza: UFC, 2000.
- MORETTI, C .L. et al. Chemical composition and physical properties of pericarp, locule and placental tissues of tomatoes with internal bruising. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 123, n. 4, p. 656-660, 1998.
- MORGADO, M. A. D. et al. Correlações fenotípicas em características físico-químicas do maracujazeiro-azedo. *Acta Agronômica*, v. 59, n. 4, p 457-461, 2010.
- OLIVEIRA, A. P. et al. Produção e qualidade fisiológica de sementes de feijão-vagem em função de fontes e doses de nitrogênio. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 25, n. 1, p. 49-55, 2003.
- PEREZ-CAMACHO, I. et al. Efecto de desarrollo y secado de semillas de *Physalis ixocarpa* Brot en germinación, vigor y contenido de azúcares. *Interciencia*, v.33, n.10, p.762- 766, 2008.
- PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G. R. M. *Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos*. Pelotas: UFPel, 2003. 415 p.
- QUEIROGA, R. C. F. et al. Influência de doses de nitrogênio na produtividade e qualidade do melão *Cantalupênsis* sob ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, v. 25 n. 4, 2007.
- REIS, D. R. D. et al. Caracterização biométrica e físico-química de pimenta variedade biquinho. *Enciclopédia Biosfera*, v. 11, n. 21, p. 454, 2015.

- RIBEIRO, F. P. et al. Correlação entre produção de sementes e tamanho de frutos de tomate, variedade Fanny grupo salada. *Horticultura brasileira*, v. 20, n. 2, 2002. Sup. 2.
- RIVERA-ESPEJEL, E. A. et al. Fertilización de tomate con nitrato y amonio en raíces separadas em hidroponía. *Revista Chapingo Série Horticultura*, v. 20, n. 1, p. 57-70, 2014.
- RUFATO, L. et al. *Aspectos técnicos da cultura da Physalis*. Lages: CAV/UEDESC; Pelotas: UFPEL, 100p. 2008.
- SANTOS, R. A.; MARTINS, D. L.; SANTOS, R. L. Balanço hídrico e classificação climática de Köppen e Thornthwaite no município de Feira de Santana (BA). *Geo UERJ*, v. 33, n. 2, p 1-17, 2018.
- SERNA, M. D. et al. The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus. *Plant and Soil*, v. 147, p. 13-23, 1992.
- SILVA, A. L. et al. Rendimento de massa seca de *Physalis angulata* L. sob proporções de nitrato e amônio em cultivo hidropônico. *Enciclopédia Biosfera*, v. 15, n. 27, p. 31-38, 2018.
- SOKRI, S. M. et al. Fruit quality and nitrogen, potassium, and calcium content of apple as influenced by nitrate:ammonium ratios in tree nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, v. 38, n. 10, p. 1-19, 2014.
- SOUZA, C. L. M. et al. Biometric characteristics of fruits and physiological characterization of seeds of *Physalis* species (Solanaceae). *Agrária*, v. 12, n. 3, p. 277-282, 2017.
- SUN, Y. D.; LUO, W. R.; LIU, H. C. Effects of different nitrogen forms on the nutritional quality and physiological characteristics of Chinese chive seedlings. *Plant Soil and Environment*, v. 60, n. 5, p. 2016-220, 2014.
- THE ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. *RHS colour chart*. London: 2001. (4 fan).
- THOMÉ, M., OSAKI, F. Adubação de nitrogênio, fósforo e potássio no rendimento de *Physalis* spp. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 8, n. 1, p. 11-18, 2010

TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *Physalis*: uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova*, v. 23. n.1 p. 47-57, 2000.

VELASQUEZ, H. J. C. et al. Estudio preliminar de la resistencia mecânica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, v. 60, n. 1, p. 3785-3796, 2007.

CAPÍTULO 5

EFEITOS DOS ÍONS NITRATO E AMÔNIO NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO E DO CARBONO EM PLANTAS DE *Physalis angulata* L.

Efeitos dos íons nitrato e amônio no metabolismo do nitrogênio e do carbono em plantas de *Physalis angulata* L.

Tamara Torres Tanan¹, Uasley Caldas de Oliveira², Alismário Leite da Silva¹, Petterson Costa Conceição Silva², Marilza Neves do Nascimento¹

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Feira de Santana, BA, Brasil.

²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Brasil.

Resumo:

Poucos estudos abordam os aspectos fisiológicos das plantas quando submetidas à nutrição com nitrato ou amônio, e esses indicam que há diferenças entre as espécies. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes proporções de nitrato e amônio no metabolismo do carbono e do nitrogênio, além da sua influência na absorção de outros íons, através da análise da taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática, transpiração, e da quantificação do teor de açúcares solúveis totais e redutores, aminoácidos, proteínas, amônio, nitrato, nitrogênio total, potássio, fósforo e atividade da enzima redutase do nitrato em folhas e raízes de *P. angulata*. Em altos níveis, o amônio reduz o teor de clorofila, a condutância estomática e a transpiração das plantas, e aumenta a concentração de açúcares e aminoácidos em raízes. Os níveis de NO₃⁻ e NH₄⁺ nos tecidos foram proporcionais a sua disponibilidade na solução nutritiva e o uso combinado das fontes nitrogenadas acarretou maior teor de N total. O NH₄⁺ reduziu a concentração de K e o NO₃⁻ limitou a concentração de P. Esses resultados demonstram que o íon disponível para absorção pela planta de *P. angulata* interfere de diversas formas no metabolismo do N e C.

Palavras-chave: fotossíntese, açúcares, aminoácidos, redutase do nitrato.

Abstract:

There are few studies on the physiological aspects of plants cultivated with nitrate or ammonium, and these indicate that there are differences between species. The aim of this study

was to evaluate the effects of different nitrate and ammonium ratios on carbon and nitrogen metabolism, besides its influence on the absorption of other ions. For this, we analyzed the rate of CO₂ assimilation, stomatal conductance, transpiration, and quantified total soluble and reducing sugars, amino acids, proteins, ammonium, nitrate, total nitrogen, potassium, phosphorus content and nitrate reductase enzyme activity in leaves and roots of *P. angulata*. At high levels, ammonium reduces chlorophyll content, stomatal conductance and plant transpiration, and increases the concentration of sugars and amino acids in roots. The NO₃⁻ and NH₄⁺ levels in the tissues were proportional to their availability in the nutrient solution and the combined use of nitrogen sources resulted in a higher total N content. The NH₄⁺ reduced the concentration of K and the NO₃⁻ limited the concentration of P. These results demonstrate that the ion absorbed by the *P. angulata* plant interferes in several ways in the metabolism of N and C.

Keywords: photosynthesis, sugars, amino acids, nitrate reductase.

Introdução

A *Physalis angulata* L. é uma planta de ampla distribuição no território brasileiro (STEHMANN et al., 2015), que apresenta potencial para a fruticultura (TANAN et al., 2018) e grande potencial medicinal, devido a produção de compostos secundários com diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória (PINTO et al., 2010), antimicrobiana (OSHO et al., 2010), efeito leishmanicida (SILVA et al., 2018), e antiproliferativo contra células cancerígenas (SUN et al., 2016). Apesar do seu potencial farmacológico ser bem investigado, sua biologia é pouco conhecida, especialmente os aspectos relacionados às respostas fisiológicas em diferentes condições ambientais.

Ao abordar a fisiologia vegetal, o metabolismo do carbono e do nitrogênio merecem destaque, pois abrangem a absorção e assimilação desses macronutrientes orgânicos, que correspondem a maior parte do peso da planta e são constituintes básicos de diversas moléculas como carboidratos, lipídios, proteínas, hormônios e ácidos nucleicos (NELSON; COX, 2014). A relação entre C-N em plantas é bem conhecida. A absorção e a assimilação do nitrogênio são altamente dependentes dos intermediários do ciclo fotossintético, por outro lado, 50 a 70% do nitrogênio absorvido e translocado para as folhas são integrantes de enzimas cloroplastídicas (CHAPMAN; BARRETO, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2017).

Altas concentrações de CO₂ podem aumentar a atividade fotossintética, entretanto, isso só é observado quando a disponibilidade de N não é um fator limitante (STITT; KRAPP, 2002; LEAKEY et al., 2009), e a eficiência no uso do nitrogênio é aumentada sob CO₂ elevado (PETTERSSON et al., 1993). Sabe-se também que a sinalização do carbono e nitrogênio influenciam umas às outras, afetando a expressão gênica de enzimas ligadas ao metabolismo (PALENCHAR et al., 2004). A estreita relação entre esses macronutrientes é percebida também em aspectos práticos, como a utilização do teor de clorofila como indicativo no status de N da planta (SOUZA et al., 2011).

A forma de N disponível para ser assimilado pelas plantas também influencia no metabolismo do C. Quando o NH₄⁺ é a forma disponível, por ser tóxico, precisa ser logo assimilado, o que aumenta a demanda por esqueletos de carbono e poder redutor, com alto consumo de 2-oxoglutarato e acúmulo de glutamina, levando ao desequilíbrio entre o metabolismo de aminoácidos e ácidos orgânicos (HACHIYA et al., 2012). Alguns estudos também relatam o efeito do NH₄⁺ sobre a atividade fotossintética (GUO et al., 2007; GUO et al., 2012).

A maioria dos estudos que avaliam a influência dos íons nitrato e amônio em vegetais enfocam seus efeitos somente no crescimento e absorção de outros íons (ANDRIOLO et al., 2006; CRUZ et al., 2006; GARCÍA et al., 2009; SILVA et al., 2010; TERRAZA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; BARTELHEIMER et al., 2013). Os trabalhos que aprofundam no conhecimento de mecanismos fisiológicos de respostas, normalmente, são realizados com *Arabidopsis thaliana* (HELALI et al., 2010; HACHIYA et al., 2012), que é comumente utilizada como planta modelo, ou com espécies amplamente utilizadas na alimentação mundial, como o arroz (HOLZSCHUH et al., 2011) e o tomate (SIDDIQUI et al., 2002; HORCHANI et al., 2010). Entretanto, esses estudos mostraram que as diferentes espécies apresentam respostas fisiológicas diferentes às fontes nitrogenadas utilizadas.

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes proporções de nitrato e amônio no metabolismo do carbono e do nitrogênio, além da sua influência na absorção de outros íons.

Material e Métodos

Sementes de *P. angulata* foram semeadas em substrato comercial em ambiente protegido, onde foram mantidas por 20 dias sob irrigação de aspersão diária para a obtenção de

mudas. Após esse período, as mudas foram transplantadas para o sistema de plantio definitivo que consistiu em um sistema hidropônico do tipo *floating*, no qual utilizou-se vasos de plástico preto contendo 6 L de solução nutritiva, cobertos por uma placa de isopor, na qual as plantas foram ancoradas. Cada vaso representou um sistema independente acoplado a um compressor de ar com sistema regulador de tempo (temporizador) para a oxigenação da solução, com duração de 20 minutos programada para cada 3 horas.

Utilizou-se a solução nutritiva de referência de Sarruge modificada para o cultivo de *Physalis* (Leite et al., 2017). Esses autores indicaram a dose recomendada de 162 mg.L^{-1} de nitrogênio, a qual foi empregada nesse experimento sob as formas nítrica e amoniacal, em cinco diferentes proporções (Tabela 1). O pH da solução foi ajustado para 5,5 e a condutividade elétrica (CE) medida periodicamente, sendo a solução trocada sempre que a CE reduzia em 30% da inicial. Para proceder à troca, os vasos foram lavados com água destilada e o volume da solução foi colocado proporcionalmente à concentração requerida para os tratamentos.

Após 35 dias do transplântio procedeu-se as avaliações. Para a análise da eficiência fotossintética, foi utilizado um Sistema de Fotossíntese Portátil - IRGA (Infra-RedGas Analyser, CIRAS-3, PPSystems, Amesbury, USA) com fonte luminosa acoplada com intensidade de $1200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Os dados foram coletados entre 08 e 10 horas da manhã, em folhas completamente expandidas, utilizando dez plantas por tratamento. Na ocasião, foram determinadas a condutância estomática ($G_s - \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a concentração de CO_2 subestomática ($C_i - \mu\text{mol mol}^{-1}$), assimilação de CO_2 ($A - \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a taxa de transpiração ($E - \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Posteriormente, amostras de folhas e raízes foram coletadas das plantas e levadas ao laboratório, onde foram lavadas com água destilada e utilizadas para as análises. Para a extração do conteúdo de clorofila, discos foliares de 0,5 cm foram colocados em tubos de ensaio vedados, envolto em papel alumínio para impedir a passagem da luz, contendo 5 ml de etanol 95%, durante 24 horas (TANAN et al., 2017). A absorv\u00eancia foi medida em espectrofot\u00f4metro de feixe duplo (FEMTO 800XI) a 664 nm e 648 nm, e os teores de clorofila total (a+b) (Chl) calculados utilizando as equa\u00e7\u00f5es propostas por Lichtenthaler (1987).

Tabela 1. Composição das soluções nutritivas utilizadas no experimento

Soluções estoque	Concentração	Proporções de NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺				
		100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
		ml L ⁻¹				
KNO ₃	1 mol L ⁻¹	4,6	2,7	1,8	0	0
Ca(NO ₃) ₂	1 mol L ⁻¹	3,5	3	1	0	0
KH ₂ PO ₄	1 mol L ⁻¹	1	1	1	1	1
KCl	1 mol L ⁻¹	3,4	5,3	7,3	8	5
CaCl ₂	1 mol L ⁻¹	1,5	2	3,5	5	5
MgSO ₄	1 mol L ⁻¹	2	1	1	1	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 mol L ⁻¹	0	1	1	1	1
NH ₄ NO ₃	1 mol L ⁻¹	0	0	2	2,9	0
NH ₄ Cl	1 mol L ⁻¹	0	0,9	1,8	6,7	9,6
MgCl ₂	1 mol L ⁻¹	0	1	1	1	1
Micro-Fe*	*	1	1	1	1	1
Fe-EDTA**	**	1	1	1	1	1

* A solução de micronutrientes foi composta por (g.L⁻¹): H₃BO₃=2,86; MnCl₂.H₂O=1,81; ZnCl₂=0,10; CuCl₂=0,04; H₂MoO₄.H₂O=0,02.

** Dissolveram-se 26,1 g de EDTA dissódico em 286 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹, misturando-se com 24,0 g de FeSO₄.7H₂O, arejando-se por uma noite e completando-se a 1 L com água destilada.

A determinação da atividade da redutase do nitrato (aRN) foi realizada através da metodologia *in vivo* proposta por Jaworski (1971), com a otimização realizada para *P. angulata* no capítulo 2 desta tese. Para o ensaio, foram utilizados fragmentos de tecido foliar e radicular e a aRN estimada em µmol de nitrito liberado por 1 g de tecido fresco por hora de incubação (µmol g⁻¹h⁻¹ NO₂⁻).

Para as determinações bioquímicas, o extrato bruto foi obtido macerando-se, em almofariz, 1g de tecido de folha em 10 mL de água destilada. O homogeneizado foi filtrado e centrifugado a 12000 × g por 15 min e o sobrenadante coletado para a realização das análises. Foram determinados os teores de açúcares solúveis totais (AST) pelo método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954), açúcares redutores (AR) pelo método do dinitrosalicilato (DNS)

(MILLER, 1959), aminoácidos livres totais pelo método da ninhidrina (YEMM; COCKING, 1955) e proteínas solúveis pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para as análises do teor de NO_3^- e NH_4^+ nas plantas, as amostras de folha e raiz foram liofilizadas e utilizadas para determinação do N-nítrico conforme método de Cataldo et al. (1975), sendo expressa em $\text{mg NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$ MS, e do N-amoniaco conforme método de Weatherburn (1967), sendo expressa em $\text{mg NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}$ MS.

Para a realização das análises químicas, as amostras de raiz e caule foram secas em estufa de circulação forçada de ar a $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 72 horas, posteriormente trituradas em moinho tipo Willey e padronizadas com peneira de 20 mesh. Aproximadamente 0,1 g do material foi submetido à digestão ácida em mistura de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio, conforme descrito por Jones (2001). O extrato obtido foi utilizado para determinação do teor de K por fotometria de chama (FAITHFULL, 2002), o teor de N pelo método do fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967) e de P pelo método do molibdo-vanadato (FAITHFULL, 2002), ambos com a leitura realizada através do espectrofotômetro UV-VIS.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 18 repetições por tratamento, totalizando 90 plantas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do *software* SISVAR (FERREIRA, 2014).

Resultados

Eficiência fotossintética e clorofila

Não foram observadas diferenças significativas para a concentração de CO_2 subestomática e assimilação de CO_2 entre as diferentes proporções de nitrato e amônio avaliadas (Tabela 2). Apesar de não diferir estatisticamente, o valor de A obtido com 0/100 de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foi inferior aos demais tratamentos. Menor G_s e E foram verificadas quando fornecido somente amônio na solução (Tabela 2). O teor de clorofila total também reduziu a medida que a concentração de amônio aumentou na solução nutritiva (Tabela 2), com o menor valor obtido no tratamento com 100% de NH_4^+ , não diferindo das proporções 50/50 e 25/75.

Conteúdo de açúcares

Diferenças no teor de carboidratos foram observadas com o uso de diferentes fontes nitrogenadas. Os maiores valores de AST, em raízes, foram obtidos com as proporções 0/100

(120,3 mg.g⁻¹MF) e 25/75 (90,3 mg.g⁻¹MF) de NO₃⁻/NH₄⁺ (Figura 1). O teor de AST em folhas nos tratamentos com 50% ou mais de N-amoniaco também foi superior comparado ao uso predominante de N-nítrico. O fornecimento de 100% de NH₄⁺ ocasionou o maior teor de AST foliar, 32,8 mg.g⁻¹MF, enquanto que o menor teor, 14,7 mg.g⁻¹MF, foi obtido com 100% de NO₃⁻ na solução nutritiva (Figura 1). Em relação aos AR, em tecido foliar, não houve diferença entre as fontes nitrogenadas aplicadas, sendo os valores superiores ao encontrado nas raízes, para todos os tratamentos. Em tecido radicular, o teor de AR foi maior com o uso combinado de nitrato e amônio, com os maiores valores para as proporções de 25/75 e 50/50 de NO₃⁻/NH₄⁺, com 1,7 e 1,4 mg.g⁻¹MF, respectivamente (Figura 1).

Tabela 2. Efeito da nutrição com diferentes proporções de nitrato e amônio na concentração de CO₂ subestomática (Ci), condutância estomática (Gs), assimilação de CO₂ (A), taxa de transpiração (E) e teor de clorofila total (Chl) em plantas de *Physalis angulata*.

Proporções NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Ci (μmol mol ⁻¹)	Gs (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	Chl (μg.cm ²)
100/0	232,4a	235,6ab	12,92a	2,55a	55,31ab
75/25	262,4a	245,8ab	10,82a	2,58a	56,15a
50/50	217,6a	303,4a	17,14a	2,82a	44,41abc
25/75	210,8a	302,8a	17,5a	2,77a	41,98bc
0/100	243,4a	107,2b	8,76a	1,39b	33,38c
CV (%)	21,92	35,80	47,08	19,88	23,31

*Letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

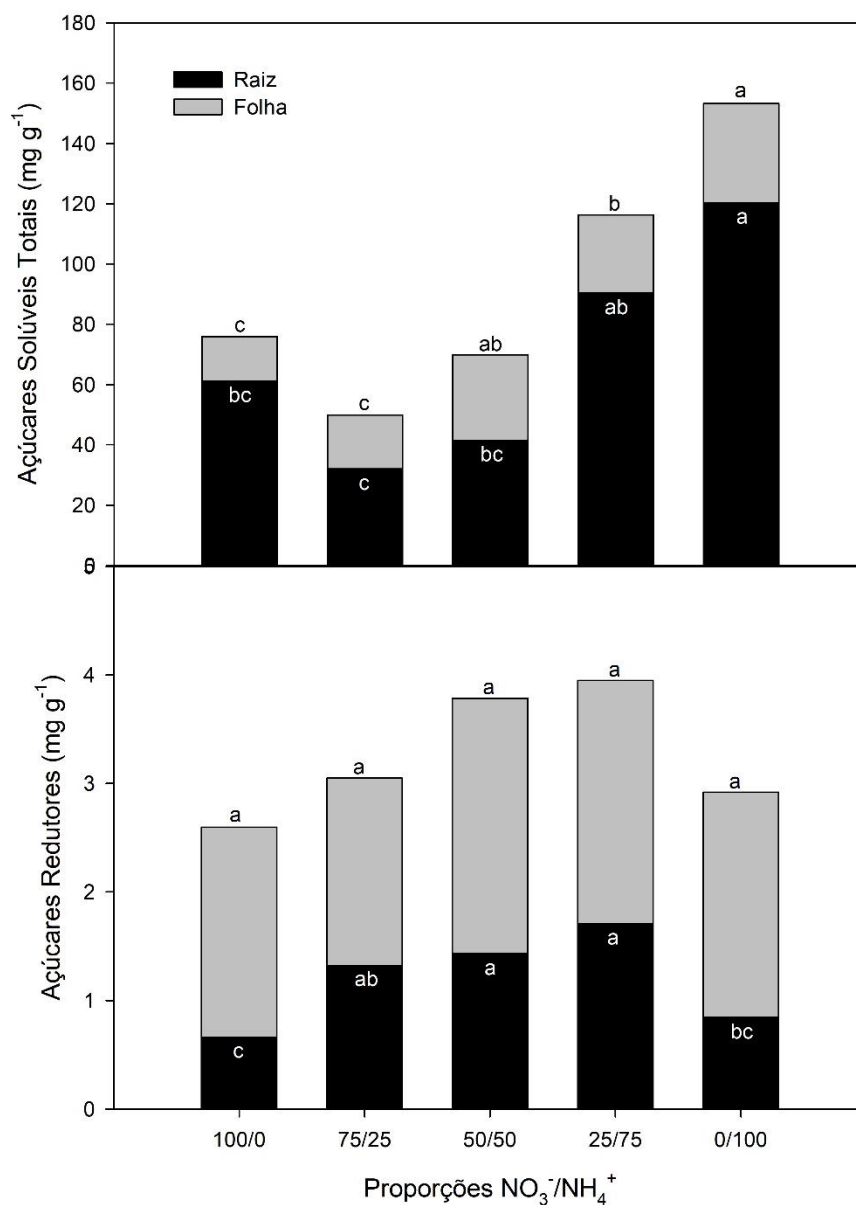


Figura 1. Teor de açúcares solúveis totais e açúcares redutores em folhas e raízes de *Physalis angulata* cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio.*Letras distintas nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Teor de aminoácidos e proteínas

O conteúdo de aminoácidos livres, em folhas, não apresentou diferença entre as diferentes proporções de nitrato e amônio utilizadas. Entretanto, em raízes, o teor de aminoácidos foi quatro vezes maior com o fornecimento de 100% de amônio, comparado aos demais tratamentos (Figura 2). O maior teor de proteínas foi encontrado em raízes de plantas

cultivadas com 25/75 de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ($2,24 \text{ mg.g}^{-1}\text{MF}$), enquanto o menor teor foi com a proporção de 75/25 ($1,16 \text{ mg.g}^{-1}\text{MF}$), entretanto, esses valores não diferiram dos demais tratamentos de 100/0, 50/50 e 0/100 (Figura 2). Quando analisado o tecido foliar, a maior quantidade de NO_3^- na solução nutritiva proporcionou maior teor de proteínas, diferindo dos tratamentos com predomínio de amônio. O menor valor foi obtido com 100% de NH_4^+ ($1,98 \text{ mg.g}^{-1}\text{MF}$), sendo 64% inferior ao obtido com 100% de NO_3^- (Figura 2).

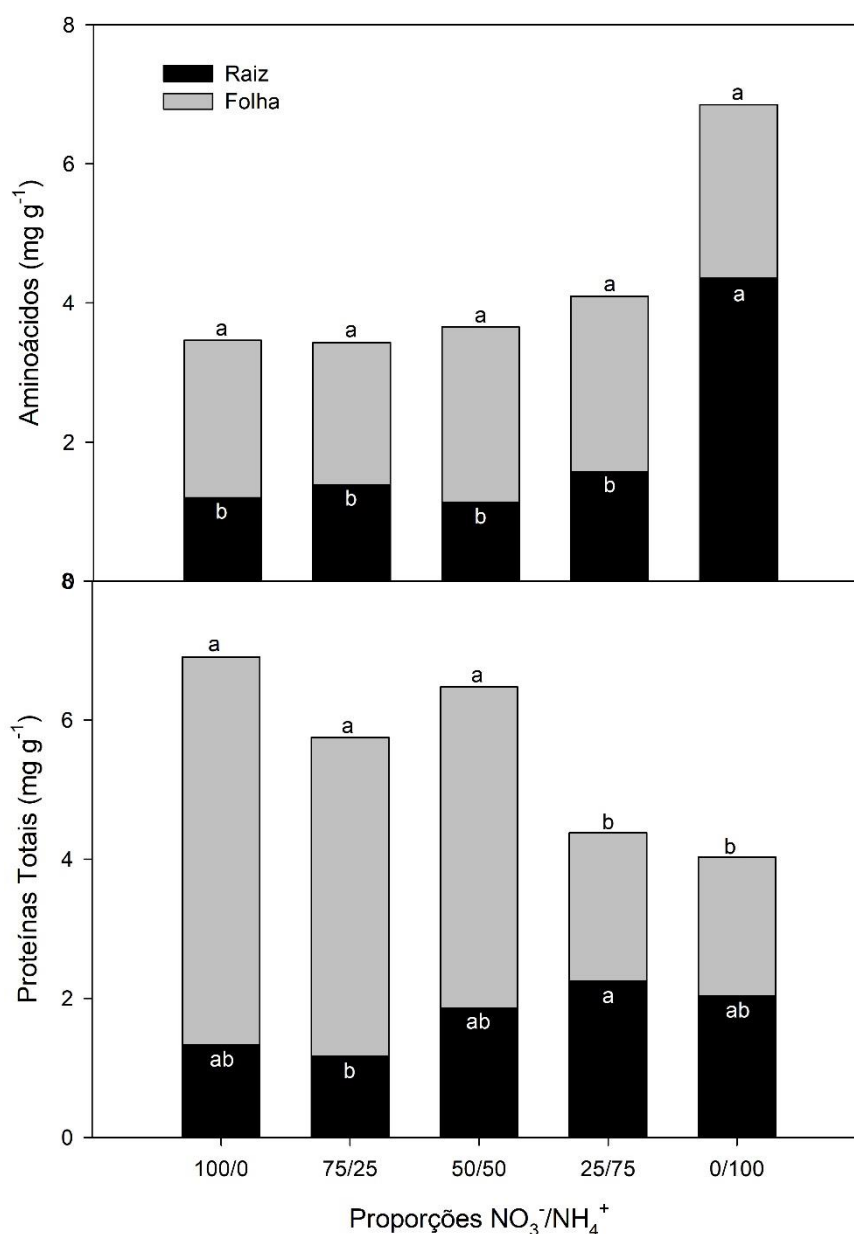


Figura 2. Teor de aminoácidos totais livres e proteínas totais em folhas e raízes de plantas de *Physalis angulata* cultivadas com diferentes proporções de nitrato e amônio. *Letras distintas nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Concentração de amônio e nitrato

O acúmulo de nitrato nas plantas, independente do tratamento, ocorreu nas raízes. A medida que se reduziu a proporção de NO_3^- fornecido na solução nutritiva, também reduziu a sua concentração nos tecidos radiculares, com a maior concentração em 100/0 (38,6 $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) e a menor com 0/100 (1,22 $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$) (Figura 3). Em folhas, o conteúdo de NO_3^- não diferiu entre o uso de fontes nitrogenadas combinadas e somente amônio, porém, foram inferiores ao tratamento com somente nitrato (Figura 3).

Com relação ao amônio, a concentração foi maior em tecido radicular em todos os tratamentos, exceto para o uso de 100% de NH_4^+ , em que o maior conteúdo foi observado nas folhas (Figura 3). O teor de amônio em folhas de *P. angulata* cultivadas somente com NH_4^+ foi muito superior aos demais tratamentos, com 5,75 $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$, comparado a 0,69, 1,20, 1,15 e 1,85 $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$ obtidos para as proporções 100/0, 75/25, 50/50 e 25/75, respectivamente (Figura 3).

Teor de NKP nos tecidos

Não houve diferença no teor de potássio em folhas de *P. angulata* em função das diferentes proporções de nitrato e amônio utilizadas. Enquanto que, na raiz, foi observada a redução de K quando foi utilizado somente N-amoniaco na solução nutritiva (Figura 4). O inverso ocorreu para o fósforo, no qual o maior teor foi obtido no cultivo com 0/100 de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, com 10,8 g.kg^{-1} e 91,06 g.kg^{-1} para o tecido radicular e foliar, respectivamente. Na folha não houve diferença no teor de P com o uso das fontes nitrogenadas combinadas em diferentes proporções, entretanto, todas foram superiores ao uso exclusivo de nitrato (43,3 g.kg^{-1}) (Figura 4).

O teor de N total em raízes foi maior com o emprego das duas fontes nitrogenadas combinadas, sendo superior aos tratamentos com somente N-amoniaco ou N-nítrico (Figura 4). Nas folhas, o maior conteúdo de N foi obtido com 100% de amônio na solução nutritiva (53,2 g.kg^{-1}), apesar disso não houve diferença em relação aos tratamentos de 100/0, 75/25 e 25/75 de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 4).

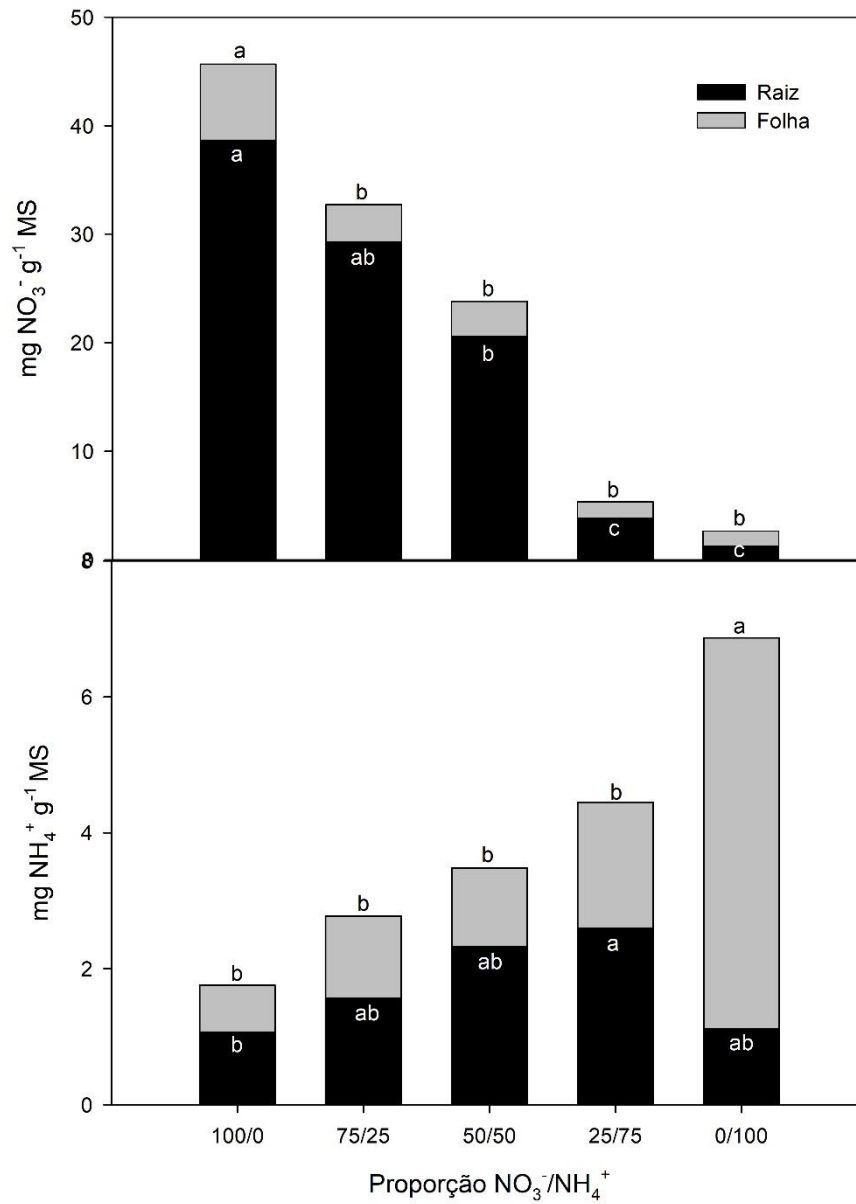


Figura 3. Teor de N-nítrico e N-amoniaco em folhas e raízes de plantas de *Physalis angulata* cultivadas em solução nutritiva com variadas concentrações de nitrato e amônio.*Letras distintas nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

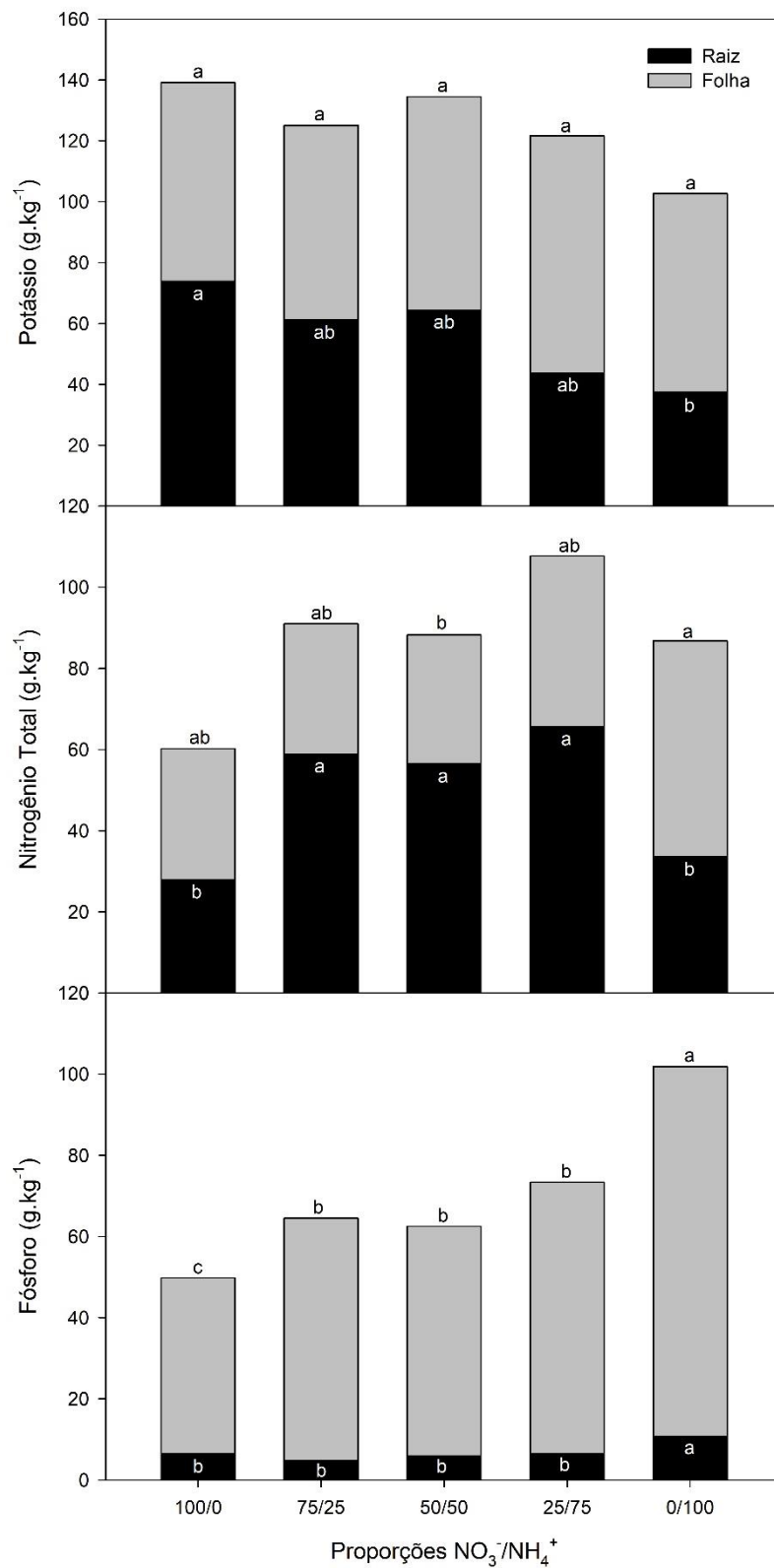


Figura 4. Teor de potássio, nitrogênio e fósforo em folhas e raízes de plantas de *Physalis angulata* cultivadas sob diferentes proporções de nitrato e amônio.*Letras distintas nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Atividade da Redutase do Nitrato

O principal sítio da aRN em *P. angulata* varia a depender da fonte nitrogenada utilizada. Nos tratamentos com presença de nitrogênio nítrico em qualquer proporção, a aRN foi maior na raiz quando comparada a folha. Nas plantas cultivadas na ausência de nitrato na solução nutritiva, o principal sítio de aRN foram as folhas (Figura 5).

Em folhas, a aRN não variou quando utilizado 100%, 75% ou 50% de NO_3^- na solução, quando houve menos que 50% de nitrato na solução nutritiva, a atividade da aRN aumentou. Diferente do observado para as raízes, que tiveram a menor atividade enzimática quando as plantas foram cultivadas em solução contendo somente amônio (Figura 5).

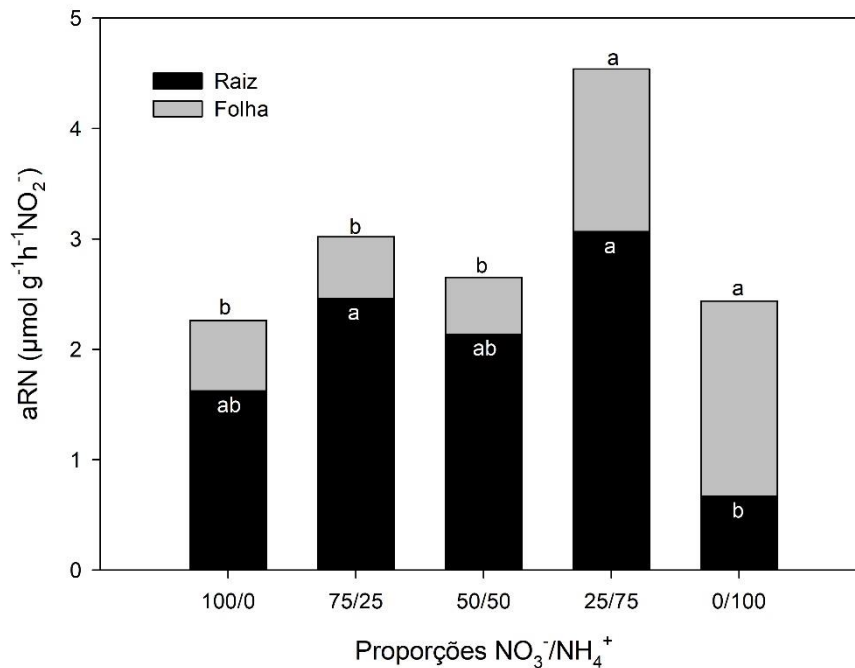


Figura 5. Atividade da redutase do nitrato (aRN) em tecidos foliares e radiculares de *Physalis angulata* cultivadas em diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

*Letras distintas nas barras diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Discussão

As plantas costumam apresentar respostas variadas quando cultivadas em soluções contendo diferentes proporções de nitrato e ou amônio. Em várias espécies vegetais, quando o amônio é a única fonte nitrogenada disponível no meio, ocorre a redução da atividade fotossintética (GUO et al., 2012; BARRETO et al., 2018). Segundo Peltier e Thibault (1983),

o NH_4^+ desacopla a cadeia transportadora de elétrons em tecidos fotossintetizantes, o que pode explicar a redução na fotossíntese. Diversos fatores podem interferir na taxa fotossintética como a intensidade de luz, atividade da Rubisco, a disponibilidade de substrato (RuBP) e a difusão do CO_2 (TAIZ; ZEIGER, 2017). Nesse estudo, a disponibilidade de CO_2 parece não ter sido um fator limitante já que a C_i não diferiu entre os tratamentos, apesar disso, o fornecimento exclusivo de NH_4^+ reduziu a condutância estomática e a transpiração, semelhante ao obtido por Guo et al. (2012) em *Catharanthus roseus*.

A relação entre abertura estomática e disponibilidade do nitrato já foi demonstrada por Guo et al. (2003), que identificaram a expressão de um transportador de nitrato de dupla afinidade em células-guardas de *Arabidopsis* e sugerem que o NO_3^- funcionaria como um contra íon ao acúmulo de K^+ durante a abertura estomática. Desse modo, a captação prejudicada de nitrato em células-guarda resulta na redução da abertura dos estômatos e na transpiração. Os resultados obtidos por Lu et al. (2005) também corroboram esses dados, no qual a nutrição exclusiva de amônio reduziu a condutância estomática e a transpiração foliar em tabaco.

Outro fator que pode influenciar na capacidade de síntese de açúcares na planta é o teor de clorofila. Apesar do amônio aumentar o volume dos cloroplastos, também há a redução da sua quantidade no tecido foliar (RAAB; TERRY, 1994) e a diminuição no teor de clorofila, relatado por diversos autores em várias espécies, como: *Arabidopsis* (HELALI et al., 2010), girassol (SILVA et al., 2010), tomate (BARRETO et al., 2018) e demonstrado aqui nesse estudo com *P. angulata*. Um dos sintomas principais da toxidez do amônio é a clorose foliar seguida da senescência da folha (BRITO; KRONZUCKER, 2002), que pode resultar do estresse oxidativo (HELALI et al., 2010). Com a clorose das folhas mais velhas, a clorofila tende a ser degradada e o N remobilizado para os órgãos em desenvolvimento.

Os altos níveis de NH_4^+ parece não terem sido limitante para disponibilidade de carboidratos na planta, pois ocasionou o aumento no teor de AST, principalmente nas raízes. Dentre os AST, a sacarose é o presente em maior quantidade e constitui o principal agente osmótico no floema (SCHEIBLE et al., 1997). A maior concentração desses açúcares em raízes de plantas cultivadas somente com NH_4^+ pode estar relacionada a manutenção da absorção de água, já que a menor condutância estomática reduz o gradiente de potencial hídrico no contínuo solo-planta-atmosfera. Assim, a síntese e exportação de sacarose das folhas para as raízes permite reduzir o potencial hídrico e manter a absorção de água (SCHEIBLE et al., 1997). Além disso, o transporte dos açúcares, oriundos da fotossíntese, da folha para a raiz pode servir

como esqueletos carbônicos e, em alguns casos, como substrato respiratório para o suprimento da energia necessária à assimilação do amônio (GIVAN, 1979; MIFLIN; LEA, 1980).

O amônio, por ser tóxico para a planta, precisa ser logo assimilado através das enzimas GS e GOGAT. Para isso é necessário o suprimento contínuo de 2-oxoglutarato e duas vias são apontadas para a sua síntese: a ação da isocitrato desidrogenase (IDH) e da aspartato aminotransferase (AspAT) (HODGES, 2002). A IDH sintetiza o 2-oxoglutarato a partir do isocitrato e requer NAD(P), ambas as formas, citosólica e mitocondrial, dependem da produção do citrato através do ciclo de Krebs (HODGES, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2017). A AspAT transfere o grupo amino do glutamato para o oxalacetato para formar o aspartato e o 2-oxoglutarato. O oxalacetato é derivado da glicólise, a partir da ação da PEP-carboxilase (PEPcase) (TAIZ; ZEIGER, 2017). Scheible et al. (1997) demonstrou que o nitrato tem um papel sinalizador no metabolismo do C, iniciando um aumento coordenado na expressão dos genes envolvidos na síntese de ácidos orgânicos. As plantas com deficiências de nitrato têm baixa atividade da PEPcase e baixos níveis de malato e citrato. Quando a ação da IDH é reduzida pela baixa quantidade de NO_3^- , a AspAT se torna a principal via de disponibilização de 2-oxoglutarato para a assimilação do amônio, com consequente degradação de proteínas, o que explica a redução no seu teor observada nas plantas de *P. angulata* cultivadas com predomínio de N-amoniaco.

A redução na concentração de ácidos orgânicos e o acúmulo de aminoácidos é uma resposta às altas concentrações de amônio no meio (BRITO; KRONZUCKER, 2002), relatado em *C. roseus* (GUO et al., 2012), *A. thaliana* (HACHIYA et al., 2012), *Stylosanthes guianensis* e *S. macrocephala* (AMARAL et al., 2000) e nesse trabalho para *P. angulata*. A necessidade da rápida assimilação do amônio acarreta no aumento dos níveis de aminoácidos no tecido, produto da atividade da GS-GOGAT, e redução nos substratos dessas enzimas. Quando cultivadas com ambas as fontes nitrogenadas, isso pode não ser limitante, pois, como já mencionado, a presença do nitrato estimula a produção de ácidos orgânicos. Entretanto, quando o suprimento é exclusivo de amônio, a concentração de 2-oxoglutarato pode estar aquém do necessário, levando ao acúmulo do NH_4^+ nos tecidos. Roosta e Schjoerring (2007) demonstraram que em tomate a suplementação com 2-oxoglutarato melhorou a assimilação de NH_4^+ e aliviou os sintomas de toxicidades, Hachiya et al. (2012) também relatam que o suprimento com succinato alivia esses sintomas.

Em plantas cultivadas em meio com predomínio de NO_3^- , a atividade da GS tende a ser maior em folhas, o contrário ocorre para o cultivo com NH_4^+ , no qual ocorre o aumento da GS na raiz (GUO et al., 2012). Para plantas de tomate, Horchani et al. (2010) observaram que, em tecido radicular, houve maior ação da GS quando o suprimento foi de amônio, e que a glutamato desidrogenase (GDH) teve sua atividade aumentada até atingir níveis semelhantes ao da GS, indicando uma correlação da GDH com a tolerância ao amônio. Apesar da atividade dessas enzimas de assimilação do N não serem avaliadas nesse trabalho, a baixa concentração de NH_4^+ e alto teor de aminoácidos na raiz das plantas cultivadas com 0/100 de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ indicam que a assimilação ocorre, principalmente, na raiz, diferente do observado para os demais tratamentos.

Segundo Epstein e Bloom (2006), a assimilação do amônio ocorre predominantemente na raiz, com posterior translocação para a parte aérea na forma de aminoácidos, e o amônio não assimilado é estocado nos vacúolos das células radiculares, evitando os possíveis efeitos tóxicos desse íon sobre outros órgãos da planta (CRUZ et al., 2006). Contudo, o observado em *P. angulata* foi o transporte de NH_4^+ para as folhas, o que pode ter ocasionado redução da parte aérea e expansão foliar (dados não mostrados).

O conteúdo de N-total foi maior, em plantas de *P. angulata*, quando cultivadas com ambas as fontes nitrogenadas, o que já foi relatado em outros estudos (BRITO; KRONZUCKER, 2002; GEORGE et al., 2016). Segundo Gazarrin (1999) e Glass et al. (2002), quando ambas as fontes de N estão disponíveis, as plantas absorvem preferencialmente o NH_4^+ ao NO_3^- , e a absorção total de N é aumentada. Plantas supridas com nitrato e amônio podem ter a taxa de absorção do amônio dez vezes maior que a do nitrato (RUAN et al., 2007), isso porque a absorção do NH_4^+ pode ser moderadamente estimulada pelo nitrato (BRITO; KRONZUCKER, 2002). Já a absorção do nitrato pode ser inibida em até 50% pelo amônio, como demonstrado por Siddiqui et al. (2002), em tomate, no qual a inibição foi de aproximadamente 25%.

Os efeitos inibitórios do NH_4^+ sobre o NO_3^- são devidos a uma combinação de seus efeitos imediatos sobre os transportadores de nitrato na membrana plasmática e ao feedback negativo do acúmulo de NH_4^+ e dos metabólitos oriundos da sua assimilação, particularmente a glutamina (SIDDIQUI et al., 2002). Mesmo quando a concentração de NO_3^- é dez vezes maior que a de NH_4^+ , as plantas tendem a absorver o NH_4^+ mais rapidamente (GESSLER et al., 1998). Nesse trabalho, para todos os tratamentos em que foi fornecido nitrato, a sua concentração

excedeu a de amônio nos tecidos, contudo esse teor pode não refletir a real absorção, já que não foi avaliada a cinética de absorção desses íons, e o NO_3^- é armazenado nos vacúolos, enquanto que o NH_4^+ é rapidamente assimilado.

O maior teor de N em plantas supridas com ambas as fontes nitrogenadas pode estar relacionado ao equilíbrio de cargas e manutenção do pH, já que a alcalinização rizosfera causada pela absorção do nitrato ajuda a neutralizar a acidificação causada pela absorção do amônio (BRITO; KRONZUCKER, 2002), e assim aumenta a disponibilidade de nutrientes. Na ausência de NO_3^- , a menor síntese de ácidos orgânicos leva a uma deficiência na carga aniônica, limitando assim o acúmulo de cátions e a capacidade de ajuste osmótico (SALSAC et al., 1987). Por outro lado, devido à similaridade de cargas e diâmetro do íon, o NH_4^+ pode ocupar os canais transportadores de baixa afinidade (LATS), diminuir a absorção de outros cátions e promover a absorção do amônio além da capacidade de assimilação da planta (HOLZSCHUH et al., 2011).

É bem relatado na literatura que o NH_4^+ reduz a absorção de outros cátions, como K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e aumenta a absorção de ânions como Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} (WILCOX et al., 1977; BRITO; KRONZUCKER, 2002). Os altos níveis de amônio reduziram a concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} em pepino (ROOSTA; SCHJOERRING, 2007), de K^+ e Ca^{2+} em *Arabidopsis* (HELALI et al., 2010), a absorção de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} em arroz (HOLZSCHUH et al., 2011) e de K^+ em tabaco (LU et al., 2005). Em plantas de tomate, 50% de amônio na solução já foi suficiente para ocasionar a redução na concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} , enquanto que a redução de K^+ ocorreu quando as plantas foram cultivadas com 100% de amônio (SIDDIQUI et al., 2002). Nesse estudo não avaliamos o teor de cálcio e magnésio em *P. angulata*, porém, a concentração de potássio na raiz foi menor com o fornecimento de amônio.

O sítio principal de assimilação do N varia entre as espécies, em *C. roseus* a atividade da RN e da GS foram maiores em folhas do que em raízes (GUO et al., 2012); em *Panicum maximum*, não foi observada atividade da RN em raiz; já em tomate, a assimilação é preferencialmente na raiz (HORCHANI et al., 2010), semelhante a *P. angulata*, na qual nos tratamentos com até 75% de nitrato, a aRN foi maior, indicando que o nitrato absorvido é logo reduzido para incorporação em moléculas orgânicas. A presença de nitrato no meio de cultivo proporcionou maior aRN radicular, o que é relatado em outros estudos (HORCHANI et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2014), sendo a maior atividade observada quando utilizada ambas as fontes de N. Resultado semelhante foi obtido por Andrade et al. (2001), com maior aRN em

plantas de *P. maximum* cultivadas com 50:50 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, sugerindo um efeito estimulador do NH_4^+ na atividade da RN, na presença de nitrato.

Apesar de altos níveis de NO_3^- induzirem a transcrição do mRNA da RN, a alta concentração de NO_3^- obtida em raízes das plantas de *P. angulata* cultivadas com 100% de N-nítrico não refletiu em maior atividade enzimática, indicando que o *pool* de nitrato não está necessariamente associado a aRN, pois pode haver a saturação da enzima, além do acúmulo de NO_3^- para posterior utilização (ANDRADE et al., 2001). Ademais, o produto da RN, o nitrito, é tóxico as plantas, bem como o amônio oriundo da sua redução pela redutase do nitrito, sendo assim, na indisponibilidade de assimilação rápida dos produtos da etapa de redução, o NO_3^- em altos níveis é acumulado, evitando a toxicidade (WANG et al., 2018).

Mesmo no tratamento com ausência de nitrato foi observada atividade da enzima, principalmente no tecido foliar, podendo estar relacionado ao acúmulo de NO_3^- no vacúolo das células no período anterior ao transplante, já que durante 20 dias as plantas cresceram em substrato comercial sem controle da fonte nitrogenada disponível. Para a maioria das espécies, a aRN é baixa ou indetectável na ausência de nitrato externo, já que essa é uma enzima induzida pelo substrato (ANDREWS et al., 1990). Entretanto, alguns autores já relataram a atividade dessa enzima quando as plantas são cultivadas somente com amônio ou na ausência de fonte nitrogenada, como em feijão (TIMPO; NEYRA, 1983) e seringueira (SHAN et al., 2012), o que também pode estar relacionado a presença de uma isoforma da RN constitutiva, não induzida pela presença de nitrato, que já foi identificada em algumas leguminosas (ANDREWS et al., 1990). Segundo Timpo & Neyra (1983), a RN constitutiva pode participar do processo de assimilação de NO_3^- desde que o nitrato seja disponibilizado como substrato ao meio de incubação no ensaio da RN *in vivo*. Entretanto, estudos são necessários para se comprovar se o mesmo ocorre com a *P. angulata*.

Conclusão

A *Physalis angulata* tem diferentes respostas fisiológicas aos íons nitrato e amônio. Os altos níveis de amônio reduzem o teor de clorofila, a condutância estomática, a transpiração e promovem o acúmulo de açúcares nas raízes. Plantas cultivadas em altos níveis de nitrato, tendem a armazenar o excesso na raiz, e esse pool não reflete necessariamente em maior atividade da RN. O fornecimento de nitrato e amônio conjuntamente aumenta a concentração de N na planta e leva ao equilíbrio de cargas, evitando a redução de outros cátions e ânions.

Referências

- AMARAL, J. A. T.; CORDEIRO, A. T.; RENA, A. B. Efeitos do alumínio, nitrato e amônio sobre a composição de metabólitos nitrogenados e de carboidratos em *Stylosanthes guianensis* e *s. macrocephala*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 313-320, 2000.
- ANDRADE, S. E. M.; SANT'ANNA, R.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P. R. **Efeito da proporção $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ na distribuição de nitrato e na atividade in vitro da redutase do nitrato em plantas de *Panicum maximum***. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001.
- ANDREWS, M.; FARIA, S. M. de; McINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. **Phytochemistry**, v.29, p.49-54, 1990.
- ANDRIOLO, J. L.; GODOI, R. S.; COGO, C. M.; BORTOLOTTI, O. C.; LUZ, G. L.; MADALAZ, J. C. Growth and development of lettuce plants at high $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratios in the nutrient solution. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 352-355, 2006.
- BARRETO, R. F.; CRUZ, F. J. R.; GAION, L. A.; PRADO, R. M.; CARVALHO, R.F. Accompanying ions of ammonium sources and nitrate: ammonium ratios in tomato plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 181, n. 3, p. 382-387, 2018.
- BARTELHEIMER, M.; POSCHLOD, P. The response of grassland species to nitrate versus ammonium coincides with their pH optima. **Journal of Vegetation Science**, v. 25, p. 760-770, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, p. 567-584, 2002.
- CATALDO, D.A., HAROON, M., SCHRADER, L.E. & YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications of Soil Science and Plant Annals**, v. 6: p.71-80, 1975.
- CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. G. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v. 89, p. 557-562, 1997.

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 467-475, 2006.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Planta, 2006. 403 p.

FAITHFULL, N.T. **Methods in agricultural chemical analysis: a practical handbook**. New York: CABI Publishing, 2002. 262p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GARCÍA, J. L. G.; MENDOZA, M. N. R.; GARCÍA, P. S.; ACUNA, E. A. G. Relación amônio/nitrato em la producción de hierbas aromáticas em hidroponía. **Agricultura Técnica em México**, v. 35, n. 1, p. 5-11, 2009.

GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W. B.; VON WIREN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, v. 11, p. 937–948, 1999.

GEORGE, J.; HOLTHAM, L.; SABERMANESH, K.; HEUER, S.; TESTER, M.; PLETT, D.; GARNETT, T. Small amounts of ammonium (NH₄⁺) can increase growth of maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, p. 717-725, 2016.

GESSLER, A.; SCHNEIDER, S.; VON SENGBUSCH, D.; WEBER, P.; HANEMANN, U.; HUBER, C.; ROTHE, A.; KREUTZER, K.; RENNENBERG, H. Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. **New Phytologist**, v. 138, p. 275–285, 1998.

GIVAN, C.V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. **Phytochemistry**, v.18, p.375-382, 1979.

GLASS, A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N.; KINGHORN, J. R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.; VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 855–64, 2002.

- GUIMARÃES, M. M. C.; CAIRO, P. A. R.; NEVES, O. S. C. Crescimento de *Eucalyptus urophylla* em meio hidropônico com diferentes proporções de nitrato e amônio. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 1, p. 52-61, 2014.
- GUO, F-Q.; YOUNG, J.; CRAWFORD, N. M. The nitrate transporter AtNRT1,1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 15, p. 107-117, 2003.
- GUO, S.; ZHOU, Y.; SHEN, Q.; ZHANG, F. Effect of Ammonium and Nitrate Nutrition on Some Physiological Processes in Higher Plants - Growth, Photosynthesis, Photorespiration, and Water Relations. **Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 21-29, 2007.
- GUO, X-R.; ZU, Y-G.; TANG, Z-H. Physiological responses of *Catharanthus roseus* to different nitrogen forms. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 589-598, 2012.
- HACHIYA, Y.; WATANABE, C. K.; FUJIMOTO, M.; ISHIKAWA, T.; TAKAHARA, K.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; UESONO, Y.; TERASHIMA, I.; NOGUCHI, K. Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. **Plant Cell Physiology**, v. 53, n. 3, p. 577-591, 2012.
- HELALI, S. M.; NEBLI, H.; KADDOUR, R.; MAHMOUDI, H.; LACHAÂL, M.; OUERGHI, Z. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Soil**, v. 336, p. 65-74, 2010.
- HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 905-916, 2002.
- HOLZSCHUH, M. J.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I.; PIZZOLATO, T. M.; CARMONA, F. C.; CARLOS, F. S. Absorção de nutrientes e crescimento do arroz com suprimento combinado de amônio e nitrato. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, p. 1357-1366, 2011.
- HORCHANI, F.; HAJRI, R.; ASCHI-SMITI, S. Effect of ammonium or nitrate nutrition on photosynthesis, growth, and nitrogen assimilation in tomato plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 173, p. 610-617, 2010.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

- LEAKEY, A. D. B.; AINSWORTH, E. A.; BERNACCHI, C. J.; ROGERS, A.; LONGO, S. P.; ORT, D. R. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 10, p. 2859-2876, 2009.
- LEITE, R. S.; TANAN, T. T.; NASCIMENTO, M. N.; OLIVEIRA, L. M.; ABREU, P. A. S. Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. **Pesqui Agropecuária Tropical**, v. 47, n.2, p. 145-151, 2017.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LU, Y. X.; LI, C. J.; ZHANG, F. S. Transpiration, potassium uptake and flow in tobacco as affected by nitrogen forms and nutrient levels. **Annals Botany**, v. 95, p. 991-998, 2005.
- MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. Ammonia assimilation. In: MIFLIN, B. J. (ed.). **Biochemistry of plants**. v. 5. New York: Academic Press, p. 169–202.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York. v.31, p. 426-428, 1959
- NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.
- OSHO, A.; ADETUNJI, T.; FAYEMI, S. O.; MORONKOLA, D. P. Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata* L. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 4, p. 303-306, 2010.
- PALENCHAR, P. M.; KOURANOV, A.; LEJAY, L. V.; CORUZZI, G. M. Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. **Genome Biology**, v. 5, n. 11, p. 1-15, 2004.
- PELTIER, G.; THIBAUT, P. Ammonia exchange and photorespiration in *Chlamydomonas*. **Plant Physiology**, v. 71, p. 888–892, 1983.
- PETTERSSON, R.; MACDONALD, J. S.; STADENBURG, I. Response of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) to elevated CO₂ and nitrogen supply. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 1115–1121, 1993.
- PINTO, N. B.; MORAIS, T. C.; CARVALHO, K. M. B.; SILVA, C. R.; ANDRADE, G. M.; BRITO, G. A. C.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Topical

anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatites in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 740-743, 2010.

RAAB, T. K.; TERRY, N. Nitrogen-source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1159-1166, 1994.

RIBEIRO, M. O.; BOECHAT, C. L.; CONCEIÇÃO, M. G. S.; MOREIRA, F. M.; RIBEIRO, L. O.; SANTOS, A. R. Efeito das interações entre os íons amônio e nitrato na fisiologia do crescimento do amendoimzeiro. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, p. 630-635, 2012.

ROOSTA, H. R.; SCHJOERRING, J. K. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, p. 1933–1951, 2007.

RUAN, J.; GERENDAS, J.; HARDTER, R.; SATTELMACHER, B. Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of tea (*Camellia sinensis*) plants. **Annals Botany**, v. 99, p. 301–310, 2007.

SALSAC, L.; CHAILLOU, S.; MOROT-GAUDRY, J. F.; LESAIN, C.; JOLIVET, E. Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 25, p. 805–812, 1987.

SCHEIBLE, W-R.; GONZÁLEZ-FONTE, A.; LAUERER, M.; MÜLLER-RÖBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell**, v. 9, p. 783-789, 1997.

SIDDIQUI, M. Y.; MALHOTRA, B.; MIN, X.; GLASS, A. D. M. Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 165, p. 191-197, 2002.

SILVA, B. J. M.; PEREIRA, S. W. G.; RODRIGUES, A. P. D.; NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E. O. *In vitro* antileishmanial effects of *Physalis angulata* root extract on *Leishmania infantum*. **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. 6, p. 404-410, 2018.

SILVA, P. C. C.; COUTO, J. L.; SANTOS, A. R. Efeito dos íons amônio e nitrato no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. **Revista da FZVA**, v. 17, n. 1, p. 104-114, 2010.

- SHAN, A. Y. K. V.; OLIVEIRA, L. E. M.; BONOME, L. T. S.; MESQUITA, A. C. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 754-762, 2012.
- SOUZA, T. R.; SALOMÃO, L. C.; ANDRADE, T. F.; VILLAS BÔAS, R. L.; QUAGGIO, J. A. Medida indireta da clorofila e sua relação com o manejo da adubação nitrogenada em plantas cítricas fertirrigadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 993-1003, 2011.
- STEHMANN, J. R.; MENTZ, L. A.; AGRA, M. F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L.; RODRIGUES, I. M. C. 2015. **Solanaceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14697>>. Acesso em: 27 fev. 2019.
- STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 6, p. 583-621, 2002.
- SUN, C. P. et al. Antiproliferative and anti-inflammatory withanolides from *Physalis angulate*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1586-1597, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**, 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TANAN, T. T., NASCIMENTO, M. N., LEITE, R. S., GUIMARÃES, D. S. 2017. Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in *Physalis angulata* L. leaves using different methodologies. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 11, p. 117-122, 2017.
- TANAN, T. T.; NASCIMENTO, M. N.; LEITE, R. S. Produção e caracterização dos frutos de espécies de *Physalis* cultivadas no semiárido baiano. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n. 3, p. 113-121, 2018.
- TERRAZA, S. P.; MURRIETA, P. L.; ROMERO, M. V.; VERDUGO, S. H. Crecimiento de plantas y rendimiento de tomate em diversas relaciones nitrato/amônio y concentraciones de bicarbonato. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 35, n. 2, p. 143-153, 2012.
- TIMPO, E. E.; NEYRA, C. A. Expression of nitrate and nitrite reductase activities under various forms of nitrogen nutrition in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, v. 72, p. 71-75, 1983.

WANG, Y-Y.; CHENG, Y-H.; CHEN, K-E.; TSAY, Y-F. Nitrate transport, signaling and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 85-122, 2018.

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

WILCOX G. E. M.; MITCHELL A.; HOFF J. E. Influence of nitrogen form on exudation rate, and ammonium, amide, and cation composition of xylem exudate in tomato. **Journal of American Society Horticultural Science**, v. 102, p. 192-196, 1977.

YEMM, E. W.; COCCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v.57, p. 508-514, 1954.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de minimizar erros e ampliar o conhecimento da espécie, essa pesquisa quis propor a adequação de protocolos para a *Physalis* e assim servir de base para o prosseguimento dos estudos na área. Como a clorofila é frequentemente utilizada como indicativo do *status* de N na planta, validar o uso do etanol 95% em suas análises é de grande valia, principalmente, por ser um método simples, de baixo custo, de fácil acesso e de pouco risco ao manuseio. A otimização do protocolo *in vivo* da redutase do nitrato, uma enzima chave do metabolismo do N, fornece dados para continuação das pesquisas sobre a ação das enzimas de assimilação do nitrogênio. A ocorrência de dois sítios de assimilação, foliar e radicular, na *P. angulata* já confirma o fato da ação enzimática diferir entre espécies e reforça a necessidade de continuação dos estudos com as demais enzimas.

Os resultados dessa pesquisa trazem novas informações acerca do metabolismo do nitrogênio em plantas de *Physalis angulata*, e demonstram que estas são mais tolerantes ao amônio do que outras espécies já bem estudadas, pois suportam quantidades de até 50% sem prejuízos ao seu crescimento, desenvolvimento, qualidade dos seus frutos e germinabilidade das sementes. De fato, a presença de amônio juntamente com o nitrato na solução nutritiva favoreceu as características citadas. As respostas fisiológicas apresentadas pela *P. angulata* quanto a nutrição nitrogenada sugere um amplo espectro de desenvolvimento dessas plantas, o que favorece o seu cultivo. Esses dados abrem portas para investigações futuras de mitigação dos sintomas de toxidez do amônio, da expressão de enzimas e transportadores, visando a maior eficiência do uso de N.