



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ALEXYANE RODRIGUES FEIJÃO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA TOLERÂNCIA DE
PLANTAS DE GIRASSOL AO ESTRESSE SALINO**

FORTALEZA

2017

ALEXCYANE RODRIGUES FEIJÃO

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA TOLERÂNCIA DE
PLANTAS DE GIRASSOL AO ESTRESSE SALINO

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

FORTALEZA

2017

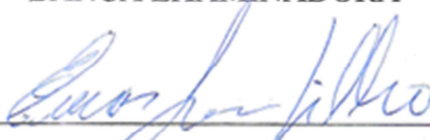
ALEXCYANE RODRIGUES FEIJÃO

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA TOLERÂNCIA DE
PLANTAS DE GIRASSOL AO ESTRESSE SALINO

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 27/02/2014

BANCA EXAMINADORA



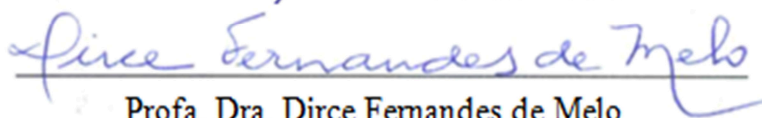
Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC



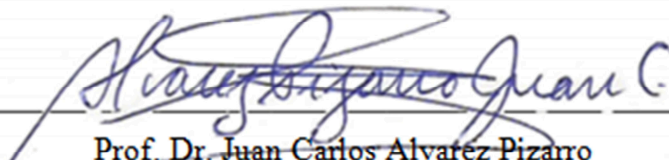
Prof. Dr. José Tarquinio Prisco

Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez Pizarro

Universidade Federal do Cariri – UFCA



Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- F328i Feijão, Alexcyane Rodrigues.
Influência de diferentes fontes de nitrogênio na tolerância de plantas de girassol ao estresse salino /
Alexcyane Rodrigues Feijão. – 2017.
115 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. Aminoácidos. 2. Amônio. 3. Nitrato. 4. Nutrição Mineral. 5. Salinidade. I. Título.

CDD 572

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos, por estar sempre presente na minha vida e tornar tudo possível.

Aos meus pais, Feijão e Socorro, pelo imenso esforço em prol de minha educação e por serem exemplos de trabalho, dedicação e compreensão, além de seu amor incondicional, estímulo e apoio constante durante toda a minha vida.

Ao meu esposo Elton, meu amigo e companheiro de todas as horas, por todo amor, ajuda, torcida e paciência. Graças a sua presença foi mais fácil superar os dias de desânimo e cansaço.

Ao meu orientador e amigo, professor Enéas Gomes Filho, a quem tenho grande admiração, pelo constante incentivo, apoio, paciência, amizade e pela confiança depositada ao longo de toda minha formação científica.

Ao amigo e professor Juan Carlos Alvarez Pizarro, por fazer parte da banca examinadora e por toda orientação, companheirismo e ensinamentos durante o período que convivemos no laboratório.

Aos professores José Tarquinio Prisco, André Dias de Azevedo Neto e Dirce Fernandes de Melo, pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pelas valiosas sugestões ao presente estudo.

Às minhas maravilhosas irmãs Alexsandra e Alexcydna, pela amizade, companhia, amor, carinho e apoio constantes. Sem elas com certeza não teria chegado até aqui.

À minha irmã do coração Tacyane, por sua paciência, companhia, amor e apoio.

A toda minha família pelo estímulo, compreensão e acima de tudo por me amar e ser tão maravilhosa e perfeita.

A todos os meus amigos, pela ajuda, apoio, companheirismo, amizade e momentos de alegria e de descontração. Em especial, à Nara Lídia Alencar e Michella Albuquerque, pessoas que conheci na academia e que hoje as tenho como irmãs.

À Maria Liliane dos Santos Silva, minha companheira de trabalho, pela sua ajuda ao longo desta caminhada.

Aos meus amigos e colegas componentes do grupo de Fisiologia Vegetal: Carlos Eduardo Braga de Abreu, Cibelle Gomes Gadelha, Daniel Farias de Oliveira, Elaine Angelim Costa Cunha de Souza, Evaldo Heber Silva do Nascimento, Franklin Aragão Gondim, Gyedre dos Santos Araújo, Ian Nunes Valença, Prof. Joaquim Enéas Filho, Jones Batista Vidal, Lineker de Sousa Lopes, Luckas Huriel Duarte de Menezes, Maria Lílian dos Santos Silva,

Nathália Dias de Oliveira Amaral, Paulo André Ferreira de Freitas, Rafael de Souza Miranda, Rosilene Oliveira Mesquita, Stelamaris de Oliveira Paula, Thalita Montoril Ferreira, Thiago Augusto Duarte de Menezes, Valdinéia Soares Freitas, Victor Freitas de Castro, Viviane Pinho de Oliveira e Viviane Ruppenthal, pelo auxílio nos experimentos, amizade, apoio e por tornarem meus dias no laboratório mais agradáveis.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, especialmente aqueles de quem tive a oportunidade de ser aluna, pelas experiências e ensinamentos compartilhados comigo, bem como aos demais membros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (estudantes e funcionários);

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa a mim concedida, bem como pelo auxílio financeiro a projetos de pesquisas do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal), que por meio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), concedeu auxílio financeiro para execução deste e de outros trabalhos do LABFIVE.

A todas as pessoas que de qualquer forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram supracitadas, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

Uma fertilização nitrogenada adequada pode reduzir os efeitos deletérios do estresse salino e promover o crescimento vegetal, sendo esse efeito dependente da fonte de nitrogênio (N) utilizada. Objetivou-se, assim, estudar a influência da fonte de N na tolerância de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) à salinidade. Para isso, sementes de girassol foram semeadas em vermiculita, em casa de vegetação, e após oito dias, as plântulas foram transferidas para um meio hidropônico com N sob as formas de NO_3^- , $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (3:1) ou NH_4^+ . Decorridos seis dias, adicionou-se NaCl até se atingir a concentração de 75 mM. As plantas foram coletadas aos 7 e 14 dias após a imposição do estresse salino. O crescimento das plantas de girassol foi reduzido pela salinidade, contudo as plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apresentaram maior crescimento da parte aérea, nas condições salinas. A condutância estomática (g_s), a transpiração (E), a fotossíntese líquida (A), a concentração interna de CO_2 (C_i), a eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) e a eficiência do uso da água (EUA) foram pouco influenciadas pela salinidade, entretanto as plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram os menores valores de g_s , A , A/C_i e EUA, em comparação às demais fontes de N. Semelhantemente, as plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram os menores teores de clorofila (a , b e total), de carotenoides e antocianinas, os quais foram pouco influenciados pela salinidade. O vazamento de eletrólitos (VE) e a peroxidação dos lipídios não foram influenciados pelas fontes de N, e a salinidade aumentou o VE. O estresse salino aumentou os teores de Na^+ e reduziu os de K^+ , principalmente nas raízes, contudo esses teores foram menores nas raízes das plantas nutridas com NH_4^+ , em comparação aos demais tratamentos de N. Em condições salinas, os maiores incrementos nos teores de Cl^- foram observados nas plantas cultivadas com NO_3^- e com $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, entretanto as plantas nutridas com NH_4^+ foram as que mais acumularam Cl^- em seus tecidos. Os teores de NO_3^- nas diversas partes das plantas e a sua translocação para a parte aérea foram reduzidos pela salinidade, sendo maiores nas plantas nutridas com NO_3^- , seguidas das nutridas com $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Os teores de NH_4^+ e a sua translocação para a parte aérea foram maiores nas plantas nutridas com esse íon, as quais acumularam também mais N-aminossolúveis e aminoácidos livres, contudo isso não foi capaz de reduzir os níveis de NH_4^+ em seus tecidos, justificando os sintomas de toxidez observados nessas plantas. Plantas nutridas com $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em comparação às nutridas com NO_3^- , acumularam mais N-aminossolúveis e os aminoácidos glutamina, asparagina, serina e prolina em condições de salinidade. De maneira geral, os teores de N-total, carboidratos solúveis e amido foram maiores nas plantas nutridas com NH_4^+ , não sendo observados efeitos da

salinidade nessas duas últimas variáveis. As enzimas do metabolismo do N foram afetadas pela salinidade, independentemente da fonte de N empregada. Nas folhas, as atividades da redutase do nitrato e da redutase do nitrito foram maiores nas plantas tratadas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Houve baixa correlação entre a atividade da sintetase da glutamina e da sintase do glutamato e os teores desses aminoácidos. Esses resultados sugerem que plantas de girassol são sensíveis ao NH_4^+ , apresentando sintomas de toxidez sob essa nutrição, mesmo em condições controle. A nutrição combinada de N ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) foi a mais eficiente em reduzir os efeitos deletérios da salinidade em plantas de girassol, pois promoveu maior crescimento e melhor balanço iônico em condições de estresse, além de as plantas sob essa nutrição terem sido as mais eficientes na utilização do N sob estresse.

Palavras-chave: Aminoácidos. Amônio. *Helianthus annuus*. Nitrato. Nutrição mineral. Salinidade.

ABSTRACT

Adequate nitrogen fertilization can reduce the deleterious effects of saline stress and promote plant growth, being this effect dependent on the nitrogen (N) source used. In this experiment, we aimed to study the influence of the N source on the tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants to salinity. In a greenhouse, sunflower seeds were sown in vermiculite, and after eight days, the seedlings were transferred to a hydroponic medium with either NO_3^- or NH_4^+ as the only N source, or a $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ mixture (3:1, v/v). After six days, NaCl was added in the nutrient solution until a concentration of 75 mM was reached. The plants were harvested at 7 and 14 days after the imposition of saline stress. The growth of sunflower plants was reduced by salinity; however the plants supplied with the $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ mixture showed the higher shoot growth under salt conditions. The stomatal conductance (g_s), transpiration (E), net photosynthetic rate (A), internal CO_2 concentration (C_i), instantaneous carboxylation efficiency (A/C_i) and water use efficiency (WUE) were little influenced by salinity. The NH_4^+ plants showed the lowest values of g_s , A , A/C_i and WUE, in comparison to the other N sources. Similarly, plants supplied with NH_4^+ showed the lowest contents of chlorophyll (a , b and total), carotenoids and anthocyanins, which were little influenced by salinity. Electrolyte leakage (LV) and lipid peroxidation were not influenced by N sources, and salinity increased LV. Salt stress increased Na^+ content and reduced K^+ content, especially in the roots, but these contents were lower in the plants supplied with NH_4^+ compared to the other N treatments. In saline conditions, the highest increase in Cl^- content was observed in plants supplied with NO_3^- and $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, however plants supplied with NH_4^+ were the more accumulated Cl^- in their tissues. The NO_3^- content in the different parts of the plants and their translocation to the shoot were reduced by the salinity, being higher in the plants supplied with NO_3^- , followed by those supplied with $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. The content of NH_4^+ and their translocation to the shoot were higher in the plants supplied with this ion, which also accumulated more N-amino compounds and free amino acids, but this was not able to reduce the NH_4^+ content in their tissues, justifying the toxicity observed in these plants. Plants supplied with $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, as compared to those supplied with NO_3^- , accumulated more N-amino compounds and glutamine, asparagine, serine and proline under salt conditions. In general, the contents of N-total, soluble carbohydrates and starch were higher in plants supplied with NH_4^+ , and no salt effects were observed in the latter two variables. Enzymes of N metabolism were affected by salinity, regardless of the N source used. In the leaves, nitrite reductase and nitrite reductase activities were higher in plants

supplied with NO_3^- and $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. There was a low correlation between the activity of glutamine synthetase and glutamate synthase and the content of glutamine and glutamate. These results suggest that sunflower plants are sensitive to NH_4^+ , showing toxicity symptoms under this nutrition, even under control conditions. The combined nutrition of N ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) was the most efficient in reducing the deleterious effects of salinity in sunflower plants, as it promoted higher growth and a better ionic balance in stress conditions. Besides the plants under this nutrition were the more efficient in the use of N under salt stress.

Keywords: Amino acids. Ammonium. *Helianthus annuus*. Nitrate. Mineral nutrition. Salinity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Massa seca das folhas, do caule e das raízes e relação entre a massa seca da parte aérea e das raízes de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 50
- Figura 2.** Área foliar de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 52
- Figura 3.** Condutância estomática, transpiração, fotossíntese líquida, concentração interna de CO₂, eficiência instantânea de carboxilação e eficiência do uso da água de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 54
- Figura 4.** Teores de clorofila *a*, *b* e total de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 56
- Figura 5.** Teores de carotenoides e de antocianinas de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 57
- Figura 6.** Vazamento de eletrólitos e teores de malondialdeído em folhas e raízes de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 59
- Figura 7.** Teores de Na⁺ em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 61
- Figura 8.** Teores de K⁺ em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 63
- Figura 9.** Relação Na⁺/K⁺ em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias..... 66

Figura 10. Teores de Cl^- em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	67
Figura 11. Teores de NO_3^- em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	70
Figura 12. Relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	72
Figura 13. Teores de NH_4^+ em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	73
Figura 14. Teores de NO_3^- e NH_4^+ na seiva do xilema de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	75
Figura 15. Teores de N-aminossolúveis em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	77
Figura 16. Teores de glutamato, glutamina, aspartato, asparagina, serina e prolina de folhas de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	79
Figura 17. Teores de nitrogênio total (N-total) em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	83
Figura 18. Teores de carboidratos solúveis em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	85
Figura 19. Teores de amido em folhas, caules e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	87
Figura 20. Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas	

a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	88
Figura 21. Atividade da redutase do nitrito em folhas e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	90
Figura 22. Atividade da sintetase da glutamina em folhas e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	92
Figura 23. Atividade da sintase do glutamato em folhas e raízes de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição dos macronutrientes nas soluções nutritivas para os diferentes tratamentos de N.....	36
Tabela 2.	Eficiências de absorção e de transporte de Na^+ em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	61
Tabela 3.	Eficiências de absorção e de transporte de K^+ em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	63
Tabela 4.	Eficiências de absorção e de transporte de Cl^+ em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	68
Tabela 5.	Eficiências de absorção e de transporte de NO_3^- em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	70
Tabela 6.	Eficiências de absorção e de transporte de NH_4^+ em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	74
Tabela 7.	Eficiência de utilização do nitrogênio em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle ou de estresse salino por 7 ou 14 dias.....	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Justificativa.....	15
1.2 Objetivos.....	18
<i>1.2.1 Objetivo geral.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2 Objetivos específicos.....</i>	<i>18</i>
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Aspectos gerais dos efeitos da salinidade nas plantas.....	19
2.2 Disponibilidade de N no solo.....	21
2.3 Absorção e transporte de NO_3^- nas plantas.....	22
2.4 Absorção e transporte de NH_4^+ nas plantas.....	24
2.5 Assimilação do N.....	25
<i>2.5.1 Redução do NO_3^- a NH_4^+.....</i>	<i>26</i>
<i>2.5.2 Assimilação do NH_4^+.....</i>	<i>27</i>
2.6 Respostas das plantas a diferentes fontes de N e à salinidade.....	29
2.7 O Girassol.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	36
3.2 Coleta e análise de crescimento.....	37
3.3 Trocas gasosas.....	37
3.4 Determinação de pigmentos fotossintéticos.....	37
3.5 Determinação de antocianina.....	38
3.6 Mensuração dos danos oxidativos.....	39
<i>3.6.1 Vazamento de eletrólitos.....</i>	<i>39</i>
<i>3.6.2 Determinação da peroxidação dos lipídios.....</i>	<i>39</i>
3.7 Determinação dos teores de íons inorgânicos.....	40
3.8 Determinação dos íons na seiva do xilema.....	41

3.9 Determinação de N-aminossolúveis.....	41
3.10 Determinação de aminoácidos.....	42
3.11 Determinação do nitrogênio total.....	44
3.12 Determinação dos carboidratos solúveis.....	44
3.13 Determinação de amido.....	45
3.14 Atividades enzimáticas.....	45
<i>3.14.1 Redutase do nitrato.....</i>	<i>45</i>
<i>3.14.2 Redutase do nitrito.....</i>	<i>46</i>
<i>3.14.3 Sintetase da glutamina.....</i>	<i>47</i>
<i>3.14.4 Sintase do glutamato.....</i>	<i>47</i>
3.15 Delineamento experimental e análise estatística.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Crescimento vegetativo.....	49
4.2 Trocas gasosas e eficiência no uso da água.....	53
4.3 Teores de clorofila.....	55
4.4 Teores de carotenoides e antocianinas.....	56
4.5 Vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios.....	58
4.6 Teores de íons.....	60
4.7 Teores de NO₃⁻ e NH₄⁺ na seiva do xilema.....	75
4.8 Teores de N-aminossolúveis.....	76
4.9 Teores de aminoácidos.....	78
4.10 Teores de nitrogênio total e eficiência no uso do nitrogênio.....	82
4.11 Teores de carboidratos solúveis.....	84
4.12 Teores de amido.....	86
4.13 Atividade das enzimas do metabolismo do N.....	88
5 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais limitam o crescimento e a produtividade agrícola (ZHU, 2001). Aproximadamente 23% das terras cultivadas do mundo vêm enfrentando problemas de salinização (FAO, 2005), sendo isso mais severo nas regiões áridas e semiáridas, onde as elevadas taxas evapotranspiratórias e as baixas precipitações pluviométricas, associadas ao manejo inadequado do solo e da água, têm contribuído para o surgimento de solos salinizados (FAGERIA; GHEYI, 1997).

A redução do crescimento causada pela salinidade é decorrente de seus efeitos osmóticos, tóxicos e nutricionais sobre as plantas (MUNNS; TESTER, 2008). O impacto dos sais sobre o potencial osmótico dos solos reduz a absorção de água pelas raízes, alterando, dessa maneira, o balanço hídrico da planta. Em adição, a absorção excessiva de íons tóxicos (principalmente Na^+ e Cl^-) pode causar distúrbios fisiológicos e nutricionais dentro da planta (MUNNS, 2002; ZHU, 2001). Essas desordens nutricionais associadas ao estresse salino podem resultar da redução da disponibilidade de nutrientes (pela competição na absorção e no transporte dentro da planta) e da alteração da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática (ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009; GRATTAN; GRIEVE, 1999; MANSOUR; SALAMA, 2004). Além disso, a extensão com que a salinidade inibe o crescimento é afetada pelo estado nutricional das plantas (IRSHAD; ENEII; YASUDA, 2008)

Dentre os nutrientes minerais, o nitrogênio (N) destaca-se por ser essencial para o crescimento das plantas, pois é requerido em grandes quantidades e sua deficiência inibe rapidamente o crescimento vegetal e, conseqüentemente, a produção (MILLER; CRAMER, 2004; WANG; HSU; TSAY, 2012). É constituinte de muitas biomoléculas tais como proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, coenzimas, vitaminas e pigmentos (WANG; HSU; TSAY, 2012). Aproximadamente, 80% de todos os íons absorvidos pelas plantas são constituídos por formas inorgânicas de N (MARSCHNER, 1995).

O nitrogênio presente no solo e disponível para as plantas apresenta-se principalmente como NO_3^- e NH_4^+ (NACRY; BOUGUYON; GOJON, 2013). Ambas as formas de N causam diferentes efeitos no crescimento, na composição química e no metabolismo das plantas (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; FORDE, 2002; LIPS *et al.*, 1990).

A salinidade interfere na aquisição e na utilização do N. Assim, condições de salinidade podem influenciar os diferentes passos do metabolismo do N, tais como a absorção, a assimilação e a síntese de proteínas, o que pode ser responsável, pelo menos em parte, pela redução na taxa de crescimento das plantas sob tais condições (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2011). A fotossíntese também é afetada pela salinidade, pelo *status* de N na planta e pela fonte de N empregada (BENDIXEN, *et al.*, 2001; GUO *et al.*, 2007; HESSINI *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm revelado que uma fertilização nitrogenada adequada pode reduzir os efeitos deletérios do estresse salino e promover o crescimento (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005; FLORES *et al.*, 2001). Entretanto, esse efeito é enormemente dependente da forma de N utilizada (NO_3^- , NH_4^+ ou a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$), da espécie da planta, da duração e da intensidade do estresse (EHLTING *et al.*, 2007; HESSINI *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrado que o crescimento das plantas é favorecido quando cultivadas em soluções ricas em NO_3^- , pois esse íon estimula o crescimento da parte aérea e atrasa a senescência (FORDE, 2002; SCHEIBLE *et al.*, 1997). Em ervilha, o suprimento de NO_3^- foi indicado como ideal para áreas afetadas pela salinidade (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005). Porém, outros trabalhos verificaram que o uso de NO_3^- como única fonte de N, sob condições de salinidade, não é benéfico para o crescimento das plantas, pois esse estresse reduz a taxa de absorção de NO_3^- , levando a um decréscimo nos teores de N na planta (BOTELLA; CERDA; LIPS, 1994; KANT *et al.*, 2007). Assim, foi observada uma maior sensibilidade à salinidade em trigo quando o NO_3^- foi a forma de N empregada (BOTELLA *et al.*, 1997; BOTELLA; CERDA; LIPS, 1994).

O íon NH_4^+ é dito como um nutriente “paradoxo”, pois, embora ele seja uma importante fonte de N e intermediário de diversas reações metabólicas, ele causa sintomas de toxicidade em muitas plantas quando cultivadas em NH_4^+ como fonte exclusiva de N (FRECHILLA *et al.*, 2001; GERENDÁS *et al.*, 1997; HOLZSCHUH *et al.*, 2011). Como exemplo, *Populus tremula*, milho e ervilha foram mais sensíveis aos sais quando nutridas com NH_4^+ (EHLTING *et al.*, 2007; FEIJÃO, 2009; FRECHILLA *et al.*, 2001). Contudo, estudos demonstraram que, em sorgo e na halófito *Spartina alterniflora*, a nutrição com NH_4^+ favoreceu as respostas destas plantas à salinidade (HESSINI *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2013). Várias espécies vegetais mostraram uma melhoria no crescimento quando nutridas com ambas as fontes (NH_4^+ e NO_3^-) em comparação às nutridas com uma única fonte de N (DUAN *et al.*, 2007; GUO; ZU; TANG, 2012; HOLZSCHUH *et al.*, 2011), sendo esse efeito mais pronunciado quando as plantas estavam sob estresse salino (KANT *et al.*, 2007; TANG

et al., 2011). Os efeitos deletérios da salinidade observados em plantas de trigo, cevada e *Catharanthus roseus* foram reduzidos pelo suprimento da mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (GARNICA *et al.*, 2009; KANT *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2011).

O controle do acúmulo de íons tóxicos, tais como Na^+ e Cl^- , é um processo fisiológico importante que confere às plantas tolerância aos sais (ASHRAF, 1994), e esse controle pode estar relacionado com a forma de N absorvida, uma vez que foram observados diferentes padrões de acúmulo e distribuição desses íons, dependendo da fonte de N empregada (ASHRAF; SULTANA, 2000; FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005; MIRANDA *et al.*, 2013). Além disso, a fonte de N influencia na assimilação do N, na síntese de aminoácidos, proteínas e carboidratos; solutos que conhecidamente acumulam-se sob estresse salino e podem contribuir para o ajustamento osmótico (GUO; ZU; TANG, 2012; KANT *et al.*, 2007; NATHAWAT *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2011). Dessa maneira, como o metabolismo do carbono e do nitrogênio são interrelacionados, as diferentes fontes de N afetam o padrão de acúmulo desses solutos em plantas (FRECHILLA *et al.*, 2001; GUO; ZU; TANG, 2012; TANG *et al.*, 2011).

O nitrogênio é o nutriente que mais limita a produção do girassol (*Helianthus annuus* L.) (BLAMEY; ZOLLINGER; SEITER, 1997), sendo que sua deficiência causa redução de 60% na produtividade e decréscimo na porcentagem de óleo da semente (SMIDERLE; GIANLUPPI; GIANLUPPI, 2002; BISCARO *et al.*, 2008). Além disso, a dose e a fonte N influenciam na qualidade das plantas para a comercialização em vasos (FAGUNDES *et al.*, 2007).

Uma eficiente nutrição de N contribui para o sucesso das plantas frente à salinidade, através de respostas capazes de ajudá-las a resistir ao estresse salino ou mesmo minimizar seus efeitos tóxicos. Dessa maneira, espera-se que a fonte de N empregada determine as repostas das plantas de girassol à salinidade. Além disso, há uma carência de estudos que relacionem a produção de biomassa, as trocas gasosas, danos de membrana, absorção de nutrientes, acúmulo de solutos compatíveis e metabolismo do N em plantas de girassol submetidas à salinidade e a diferentes fontes de N. Visto que o girassol é uma cultura de grande importância econômica, considerada moderadamente sensível aos sais (KATERJI *et al.*, 2000), e dada a elevada exigência por N em seu cultivo tornam-se relevantes estudos que tratem da influência de diferentes fontes de N na tolerância de plantas de girassol ao estresse salino.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos do NO_3^- , do NH_4^+ e da combinação dessas formas de N na tolerância de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) à salinidade.

1.2.2 Objetivos específicos

Utilizando-se plantas de girassol da variedade Catissol, sob condições controle e de estresse salino, avaliou-se o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (NO_3^- , NH_4^+ e $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$):

- Na área foliar e no acúmulo de biomassa da planta;
- Nas trocas gasosas: condutância estomática, fotossíntese líquida, transpiração e concentração interna de CO_2 ;
- Nos teores de clorofila *a*, *b* e *total*, carotenóides e antocianinas;
- Nos danos oxidativos, através da determinação do vazamento de eletrólitos e da peroxidação lipídica em folhas e raízes;
- Nos teores dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- e NH_4^+ em folhas, caules e raízes;
- No transporte dos íons NO_3^- e NH_4^+ através da seiva do xilema;
- Nos teores de N-aminossolúveis e nitrogênio total em folhas, caules e raízes;
- Nos teores dos aminoácidos glutamato, aspartato, glutamina, asparagina, serina e prolina nas folhas;
- Nos teores de carboidratos solúveis e amido em folhas, caules e raízes;
- Na atividade das enzimas envolvidas na assimilação do N (redutase do nitrato, redutase do nitrito, sintetase da glutamina e sintase do glutamato), em folhas e raízes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais dos efeitos da salinidade nas plantas

A salinidade é uma condição do solo caracterizada pela elevada concentração de sais solúveis. Os solos são classificados como salinos quando a condutividade elétrica do extrato de saturação é igual ou superior a 4 dS m^{-1} (USDA-ARS, 2008), o qual equivale a aproximadamente 40 mM de NaCl (MUNNS; TESTER, 2008).

O estresse salino é um dos principais fatores limitantes da produção agrícola, em razão de seus efeitos no crescimento e no desenvolvimento vegetal, os quais podem ser de natureza iônica, osmótica ou de ambas (HASEGAWA *et al.*, 2000; HASEGAWA, 2013; MUNNS; TESTER, 2008). Os efeitos deletérios da salinidade sobre o crescimento das plantas são devidos aos seguintes fatores: 1) diminuição da quantidade de água disponível para a planta, em razão da redução do potencial hídrico do solo; 2) toxicidade causada pela elevada absorção de íons Na^+ e Cl^- , principalmente; 3) desbalanço nutricional ocasionado pela inibição da absorção de vários nutrientes; 4) aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que prejudicam a integridade de moléculas e organelas celulares (GREENWAY; MUNNS, 1980; PRISCO; GOMES-FILHO, 2010).

Com a redução do potencial osmótico do solo, o potencial hídrico também diminui, reduzindo o gradiente de potencial hídrico entre a planta e o solo. Dessa forma, a absorção de água pela planta é dificultada, gerando, assim, déficit hídrico. A água nas células vegetais tem a importante função de gerar a pressão de turgescência (XIONG; ZHU, 2002). Com a redução na disponibilidade de água para as plantas em ambientes salinos, a turgescência — fundamental para que ocorra a expansão celular — também é reduzida (ZHU, 2001). Um dos efeitos mais notórios da salinidade sobre o crescimento é a redução da área foliar disponível para a fotossíntese, levando à diminuição da biomassa da planta (PARIDA; DAS, 2005).

Uma das respostas das plantas ao estresse hídrico, provocado pelo excesso de sais, é a redução na condutância estomática, causando uma diminuição na fotossíntese líquida (YU; WANG; WANG, 2012). Assim, apesar de reduzir a perda de água através da transpiração, em curto prazo, o fechamento dos estômatos é o principal fator limitante da fotossíntese (DAVIES; ZHANG, 1991; GREENWAY; MUNNS, 1980). Em longo prazo, o excesso de íons tóxicos no mesófilo inibe a fotossíntese por meio de mecanismos não estomáticos, reduzindo o conteúdo total de clorofila, o transporte de elétrons nos cloroplastos e,

consequentemente, causando um decréscimo na eficiência do fotossistema II (PARIDA; DAS; MITTRA, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013). Outra resposta ao estresse salino é o acúmulo líquido de diferentes solutos, que reduzem o potencial osmótico da planta, tornando possível a manutenção da absorção de água e da pressão de turgescência, mecanismo conhecido como ajustamento osmótico (GREENWAY; MUNNS, 1980; SMIRNOFF, 1998; YU; WANG; WANG, 2012). Esse fenômeno resulta tanto da acumulação de íons inorgânicos no vacúolo, quanto do acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular no citosol (ASHRAF; HARRIS, 2004), os quais não interferem com o metabolismo celular normal, mesmo estando em altas concentrações (SAIRAM; TYAGI, 2004). Por essa razão, esses compostos são também chamados de solutos compatíveis (BOHNERT; NELSON; JENSEN, 1995). Além de seu papel estritamente osmótico, tais solutos orgânicos contribuem também para a estabilidade das proteínas e das membranas celulares, ao promoverem a remoção de radicais livres, gerados pelo estresse oxidativo secundário (MANSOUR, 2000).

Os efeitos iônicos do estresse salino resultam da elevada absorção de íons, especialmente Na^+ e Cl^- , que alteram a homeostase iônica da célula quando em altas concentrações, causando uma redução no crescimento devido a efeitos iônicos específicos (YU; WANG; WANG, 2012). Isto se deve, provavelmente, à capacidade limitada das células em compartimentar os íons no vacúolo, permitindo que suas concentrações no citosol ou em outras organelas aumentem rapidamente e afetem a atividade de várias enzimas metabólicas. Por outro lado, esses íons podem ser transportados para as paredes celulares e causar a desidratação das células (MUNNS, 2002, 2005).

O excesso de sais no solo pode resultar em desbalanços e deficiências nutricionais na planta (ZHU, 2003). Elevadas concentrações de Na^+ e Cl^- na solução do solo acarretam altas relações $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/K^+ , $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$, $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ e $\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ no interior das células, as quais têm sido frequentemente relacionadas com reduções no crescimento, inibição da fotossíntese e desestabilização de membranas (ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009; FEIJÃO *et al.*, 2013; GRATTAN; GRIEVE, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2012). Os distúrbios nutricionais associados ao estresse salino podem resultar da redução da disponibilidade de nutrientes essenciais, pela competição na absorção e no transporte dentro da planta, por alterações na integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, bem como pela inibição da atividade de várias enzimas vitais do metabolismo, resultando no aumento do requerimento da planta por esse elemento essencial (ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009; ARAGÃO *et al.*, 2010; MANSOUR; SALAMA, 2004). Assim, em geral, o excesso de Na^+ pode conduzir à deficiência de K^+ e Ca^{2+} e a absorção de NO_3^- pode ser inibida por Cl^-

(SHANNON, 1992). Como resultado, a planta torna-se susceptível a distúrbios osmóticos ou íon-específicos, bem como a desordens nutricionais que podem resultar na redução da produção ou da qualidade das culturas (GRATTAN; GRIEVE, 1999).

Secundariamente, o acúmulo excessivo de sais altera o metabolismo das plantas aumentando a produção de EROs, que são prejudiciais à célula quando em altas concentrações, causando danos oxidativos às biomoléculas (AZEVEDO-NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008; CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Durante o estresse salino, todos os principais processos da planta, tais como a fotossíntese, a respiração, a síntese proteica, as relações hídricas e as reações enzimáticas, são afetados (MUNNS, 2002; PARIDA; DAS, 2005); os sais acumulados progressivamente, portanto, podem até mesmo conduzir a planta à morte (MANSOUR; SALAMA, 2004).

A sobrevivência das plantas em ambientes salinos depende de alguns mecanismos, as quais incluem: alterações morfológicas e desenvolvimentais (por exemplo, encurtamento do ciclo de vida e modificação do crescimento da parte aérea e da raiz); controle da absorção de íons pela raiz e transporte para as folhas; extrusão e/ou compartimentação de íons no vacúolo; acúmulo de solutos orgânicos compatíveis no citoplasma; alterações na estrutura da membrana plasmática; indução da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes; e alterações no balanço hormonal. Esses mecanismos têm por finalidade reduzir os danos causados pelo estresse salino às plantas, atingindo assim, o restabelecimento da homeostase celular e, finalmente, a retomada do crescimento vegetal, mesmo que com uma velocidade reduzida (BOTELLA *et al.*, 2005; GREENWAY; MUNNS, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000; MANSOUR; SALAMA, 2004; MUNNS; TESTER, 2008; PARIDA; DAS, 2005; ZHU, 2001).

2.2 Disponibilidade de N no solo

A maior parte do N no solo (> 90%) está presente na forma de moléculas orgânicas complexas, as quais são relativamente estáveis e não diretamente disponíveis para as plantas (BELOW, 2001). Contudo, essas moléculas podem ser convertidas a NH_4^+ por microorganismos do solo. O NH_4^+ pode então ser oxidado a NO_3^- através de um processo denominado nitrificação, realizado pela ação de bactérias *Nitrosomonas* ssp. ($\text{NH}_3 + 3/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$) e *Nitrobacter* ssp. ($\text{NO}_2^- + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$). O NO_3^- , por sua vez, pode ser convertido a N_2 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), através de seu uso como acceptor de elétrons por bactérias desnitrificantes (*Pseudomonas* ssp. e *Paracoccus* ssp.) (MILLER;

CRAMER, 2004). Em conjunto, esses processos constituem o chamado ciclo do nitrogênio, no qual o conteúdo global de N é trocado entre a atmosfera, o solo e a biomassa (MILLER; CRAMER, 2004).

Em quase todos os ecossistemas, as plantas absorvem N principalmente nas formas inorgânicas NO_3^- e NH_4^+ , em vez de aminoácidos ou outras formas de N orgânico, os quais, aparentemente, desempenham um papel secundário, sendo somente utilizados em ecossistemas extremamente pobres em N e frios, onde a mineralização da matéria orgânica é bastante limitada (NACRY; BOUGUYON; GOJON, 2013). A concentração de NO_3^- no solo varia entre 1 e 5 mM, podendo-se alcançar valores bastante inferiores, de até 5 μM , em consequência de sua ampla utilização pelas plantas e microrganismos e, adicionalmente, de sua lixiviação do solo (MENGEL; KIRKBY, 1987; MILLER; CRAMER, 2004; OWEN; JONES, 2001). De maneira geral, na maioria dos solos agricultáveis, as plantas absorvem N principalmente como NO_3^- . Isso acontece pelo fato de o NO_3^- estar presente em maiores concentrações em relação ao NH_4^+ e por ele se mover livremente dentro do solo, devido a predominância de cargas negativas nas partículas do solo (MILLER; CRAMER, 2004). As concentrações de NH_4^+ em solos agricultáveis, tipicamente, variam entre 20 e 200 μM (OWEN; JONES, 2001). Contudo, fatores que inibem o processo de nitrificação, tais como pH baixo, condições anaeróbicas e temperaturas abaixo de 5 °C e acima de 40 °C, podem resultar no acúmulo de NH_4^+ no solo (LEWIS, 1986; MENGEL; KIRKBY, 1987; MILLER; CRAMER, 2004). O NH_4^+ é relativamente imóvel no solo e menos facilmente perdido pela lixiviação do solo que o NO_3^- (MILLER; CRAMER, 2004).

Diversos fatores podem alterar a disponibilidade de NO_3^- e NH_4^+ às plantas, tais como a temperatura, o pH e o grau de aeração da rizosfera (MENGEL; KIRKBY, 1987). Dessa forma, em solos aerados e com pH acima de 4, o NO_3^- é a principal fonte de N inorgânico, sendo o NH_4^+ encontrado em baixas concentrações. Contudo, em solos alagados, a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ é reduzida, principalmente em consequência da desnitrificação do NO_3^- e da diminuição da nitrificação (ARMSTRONG, 1982).

2.3 Absorção e transporte de NO_3^- nas plantas

As plantas absorvem o NO_3^- presente na solução do solo através da membrana plasmática de células da epiderme e do córtex da raiz, principalmente nas regiões mais jovens (região apical) (TAIZ; ZEIGER, 2013). Esse processo ocorre por meio de um transporte simultâneo (cotransporte) de 2 H^+ e um NO_3^- do meio externo para o interior da célula, o qual

é dirigido pelo gradiente de prótons (ΔH^+) gerado pelas H^+ -ATPases da membrana plasmática, sendo, portanto, dependente de ATP (FORDE, 2000; KRAISER *et al.*, 2011). Em *Citrus*, a absorção de NO_3^- foi severamente afetada pela presença de inibidores e desacopladores da fosforilação oxidativa, denotando a dependência energética desse processo para a geração do ΔH^+ pelas H^+ -ATPases (CEREZO *et al.*, 2000).

Em plantas superiores, os transportadores ou canais de NO_3^- na membrana, identificados até hoje, pertencem a cinco famílias de proteínas denominadas NRT1 (do inglês, *Nitrate Transporter*), NRT2, CLC (do inglês, *Chloride Channel*) ALMT (do inglês, *Aluminum-Activated Malate Transporter*) e SLAC1 (do inglês, *Slow Anion Channel*). Entretanto, apenas os membros da família NRT1 e NRT2 parecem estar envolvidos com a absorção de NO_3^- nas raízes (NACRY; BOUGUYON; GOJON, 2013). Há três distintos sistemas de absorção de NO_3^- , definidos com base na concentração externa de NO_3^- em que operam, sendo dois deles de alta afinidade, os quais atuam em concentrações externas de NO_3^- inferiores a 1 mM, enquanto o terceiro possui baixa afinidade e atua em concentrações externas de NO_3^- superiores a 1 mM (FORDE, 2000; WILLIAMS; MILLER, 2001).

Dentre os sistemas de alta afinidade, um deles é fortemente induzido pela presença de NO_3^- no meio externo, sendo conhecido como iHATS (do inglês, *Inducible High-Affinity Transport System*), enquanto o outro é constitutivamente expresso, sendo denominado cHATS (do inglês, *Constitutive High-Affinity Transport System*). Transportadores de NO_3^- de alta afinidade são predominantemente encontrados na família NRT2, os quais compreendem 7 genes em *Arabidopsis thaliana* (OKAMOTO; VIDMAR; GLASS, 2003; ORSEL; KRAPP; DANIEL-VEDELE, 2002). Por sua vez, o sistema de absorção de NO_3^- de baixa afinidade, conhecido como LATS (do inglês, *Low-Affinity Transport System*), é também constitutivamente expresso, apresentando cinética de absorção linear e não saturável (BRITTO; KRONZUCKER, 2005; KRAISER *et al.*, 2011), sendo esses transportadores pertencentes à grande família NRT1, que também compreendem os transportadores de nitrito, peptídeos ou ácidos carboxílicos (FORDE, 2000; TSAY *et al.*, 2007).

Como mencionado anteriormente, a regulação do processo de influxo de NO_3^- na membrana plasmática é realizada pelo próprio NO_3^- . Este íon age como um sinal para induzir a síntese de proteínas envolvidas em sua própria aquisição (BRITTO; KRONZUCKER, 2005). Dessa maneira, a regulação da absorção de NO_3^- depende da expressão de genes que codificam os transportadores na membrana plasmática, tendo como sinalizador local o próprio NO_3^- (FORDE, 2002). De maneira semelhante, o NO_3^- exerce uma *feedback* positivo em seu carregamento no xilema através de canais dependentes de voltagem (MILLER; CRAMER,

2004). A entrada do NO_3^- no xilema é provavelmente mediada por canais de ânions (X-IRAC, X-QUAC) (KOHLENER; RASCHKE, 2000), os quais foram bem caracterizados em cevada (KOHLENER *et al.*, 2002). Altas concentrações de NO_3^- podem ser encontradas na seiva do xilema, especialmente em plantas que transportam a maior parte deste íon absorvido para a parte aérea, onde ocorrerá sua redução (MILLER; CRAMER, 2004). Além da regulação exercida pelo NO_3^- , o transporte desse íon para a parte aérea, via xilema, é altamente dependente da taxa de transpiração (MILLER; CRAMER, 2004; ARAGÃO *et al.*, 2010).

No interior das células das raízes, o NO_3^- pode seguir quatro diferentes rotas: (a) ser reduzido a NH_4^+ , o qual, por sua vez, é posteriormente assimilado em compostos orgânicos; (b) sofrer efluxo para o apoplasto, através da membrana plasmática; (c) sofrer influxo para o vacúolo, através do tonoplasto; ou (d) ser transportado para a parte aérea, via xilema, para ser assimilado nas folhas, uma vez que somente parte do NO_3^- absorvido é assimilado nesse órgão (CRAWFORD; GLASS, 1998; FORDE, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013).

2.4 Absorção e transporte de NH_4^+ nas plantas

Assim como para o NO_3^- , a absorção do NH_4^+ presente na solução do solo se dá através da membrana plasmática de células da epiderme e do córtex da região apical da raiz (TAIZ; ZEIGER, 2013). A absorção de NH_4^+ pelas raízes envolve transportadores de alta afinidade da família AMT (do inglês, *Ammonium Transporter*), os quais mais provavelmente funcionem como uniporte ou simporte com o H^+ , sendo o NH_4^+ transportado através de um gradiente de potencial eletroquímico (GAZZARINI *et al.*, 1999; LUDEWIG *et al.*, 2003; NACRY; BOUGUYON; GOJON, 2013; XU; FAN; MILLER, 2012;). A família AMT foi estudada em várias espécies, tais como, *A. thaliana* (LUDEWIG *et al.*, 2001), tomate (LAUTER *et al.*, 1996), arroz (KUMAR *et al.*, 2003), *Lotus japonicus* (D'APUZZO *et al.*, 2004) e *Citrus sinensis* (CAMANES *et al.*, 2007). Além disso, há evidências de que o NH_4^+ também possa ser absorvido através de canais de K^+ , e esta pode ser uma importante rota para a entrada de NH_4^+ nas células das raízes (MILLER; CRAMER, 2004; WHITE, 1996).

Ainda não está claro se o NH_4^+ *per se* também tem uma ação de sinalização, semelhante ao NO_3^- , que induz seus próprios sistemas de transportes (AMTs). De acordo com Mack e Tischner (1994), a absorção radicular de NH_4^+ foi estimulada transitoriamente após a reintrodução de NH_4^+ , depois um período de baixo fornecimento de N. No entanto, na maioria das espécies de plantas investigadas até o momento, a expressão dos genes *AMT* é reprimida

em vez de induzida pelo NH_4^+ (BRITTO; KRONZUCKER, 2005; LAUTER *et al.*, 1996; VON WIREN *et al.*, 2000;). Como exceção a essa tendência geral, além do trabalho de Mack e Tischner (1994), referido anteriormente, pode-se também citar o de Sonoda *et al.* (2003). Por outro lado, o NH_4^+ parece ter fortes efeitos sobre a expressão e/ou a atividade dos sistemas de transporte de NO_3^- na raiz, desempenhando, assim, um papel-chave na regulação global da aquisição de N pela planta (NACRY; BOUGUYON; GOJON, 2013).

Antigamente, acreditava-se que o NH_4^+ absorvido ou gerado nas raízes era inteiramente assimilado nesse órgão e não era translocado para a parte aérea (TOBIN; YAMAYA, 2001). Contudo, Schjoerring *et al.* (2002) demonstraram que a translocação de NH_4^+ no xilema de fato ocorre. Esses autores observaram concentrações de NH_4^+ de até 1 mM na seiva xilemática de plantas de canola e tomate cultivadas com NO_3^- como única fonte de N. Quando o NO_3^- foi substituído por NH_4^+ no cultivo dessas plantas, a concentração de NH_4^+ no xilema aumentou com o aumento da concentração externa e com o tempo de exposição ao NH_4^+ . Entretanto, em plantas de arroz, o conteúdo de NH_4^+ na seiva do xilema não diferiu significativamente com o aumento da proporção de $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva (HOLZSCHUH *et al.*, 2011). O mecanismo para o carregamento do NH_4^+ dentro do xilema ainda não é bem conhecido, no entanto pode ocorrer através de transportadores que, geralmente, são mais utilizados pelo K^+ (MILLER; CRAMER, 2004).

2.5 Assimilação do N

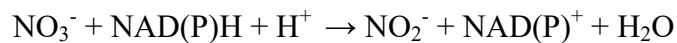
Para que possa ser incorporado em estruturas orgânicas e cumprir suas funções essenciais como nutriente para as plantas, o NO_3^- deve ser inicialmente reduzido a NH_4^+ (MARSCHNER, 1995). O íon NO_3^- é reduzido pela reação sequencial da redutase do nitrato (NR), no citosol, e da redutase do nitrito (NiR), nos plastídios e/ou cloroplastos. O íon NH_4^+ derivado da redução primária do NO_3^- , bem como de outras vias metabólicas (absorção direta pelas raízes, fotorrespiração e catabolismo dos aminoácidos) é então convertido primeiramente a glutamina, pela enzima sintetase da glutamina (GS), e, em seguida, a glutamato, pela ação da enzima sintase do glutamato (Fd-GOGAT e NADH-GOGAT) (IRELAND; LEA, 1999). O íon NH_4^+ pode também ser assimilado por uma via alternativa, através da reação reversível da enzima desidrogenase do glutamato (NADH-GDH), que sintetiza ou desamina o aminoácido glutamato, porém, essa via só ocorre em condições de excesso de NH_4^+ (CORUZZI; LAST, 2000). A atividade das enzimas de assimilação do N

pode ser regulada em diferentes níveis; transcricional, traducional e pós-traducional (MILLER; CRAMER, 2004).

O local em que ocorre a redução do NO_3^- e a subsequente assimilação do NH_4^+ (na raiz ou na parte aérea) varia entre as espécies, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais (MILLER; CRAMER, 2004). A importância da assimilação do N para a vida das plantas é comparável à assimilação do C na fotossíntese (MARSCHNER, 1995).

2.5.1 Redução do NO_3^- a NH_4^+

A NR é a enzima que catalisa o primeiro passo da redução do NO_3^- e está localizada no citosol (TISCHNER, 2000). A reação catalisada é a seguinte:



Essa reação leva à produção de NO_2^- e necessita de NADH/NADPH ou de ambos (no caso de isoforma biespecífica) como doador de elétrons (TISCHNER, 2000). A isoforma mais comum da NR é NADH-específica, no entanto, em tecidos não clorofilados, tal como a raiz, há outra isoforma, a qual pode utilizar tanto o NADH como o NADPH como doadores de elétrons (WILKINSON; CRAWFORD, 1993). A NR é um homodímero composto de duas subunidades idênticas de aproximadamente 100 kDa, cada uma contendo três grupos prostéticos: flavina adenina dinucleotídeo (FAD), heme-Fe e um complexo formado entre o molibdênio e uma molécula orgânica denominada pterina, o Mo-molibdopterina (Mo-MPT) (CAMPBELL, 1999).

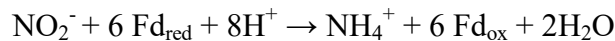
O mecanismo da NR envolve a passagem dos elétrons do NADH/NADPH para o NO_3^- a partir do grupo carboxila terminal (C-terminal) da enzima até o grupo amino terminal (N-terminal). O sítio específico em que ocorre a redução do NO_3^- corresponde ao complexo Mo-MPT (TAIZ; ZEIGER, 2013). Stöhr e Ullrich (2002) descreveram uma forma de NR que é encontrada na membrana plasmática e que pode gerar óxido nítrico (NO).

O NO_3^- induz a atividade da NR através do aumento da expressão de seus genes codificantes (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1991). Essa indução é bastante rápida, ocorrendo em minutos e requerendo baixíssimas concentrações de NO_3^- (menores que 10 μM) (CRAWFORD, 1995). Utilizando anticorpos específicos para a NR, Remmler e Campbell (1985) demonstraram que, em folhas de plantas de milho e cevada, a indução da atividade da NR por NO_3^- envolveu o processo de síntese *de novo*. Adicionalmente, a expressão dos genes da NR (*NIA*) pode ser regulada pelos produtos finais do processo de assimilação do N (como os aminoácidos glutamina, glutamato e asparagina), através de *feedback* negativo (STITT *et*

al., 2002), bem como por baixos níveis de açúcares e outros assimilados, através de *feedback* positivo (NUSSAUME *et al.*, 1995).

Além da regulação a nível transcricional, a atividade da enzima NR pode ser modulada por fosforilação reversível de um resíduo de serina da proteína. Porém, foi demonstrado que a fosforilação *per se* não é suficiente para inativar a NR, sendo necessária uma proteína adicional, a NIP (do inglês *Nitrate Reductase Inhibitor Protein*), identificada como um dímero de proteínas 14-3-3 que, na presença de íons bivalentes, liga-se à NR previamente fosforilada, causando sua inibição completa (KAISER; HUBER, 2001). Algumas mudanças ambientais podem causar a desfosforilação da NR, sendo esta enzima ativada em condições de luz, anoxia, altas concentrações de CO₂ e açúcares (DEBOUBA *et al.*, 2006a; KAISER; BRENDLE-BEHNISCH, 1991; KAISER; FOSTER, 1989). Além disso, em raras ocasiões, a NR é induzida por NH₄⁺ ou ureia (GARNICA *et al.*, 2010; MATRASZEK, 2008).

O NO₂⁻ formado na reação catalisada pela NR, por ser bastante tóxico, deve ser rapidamente transportado para o interior dos cloroplastos, nas folhas, e dos plastídios, nas raízes. Nessas organelas, a NiR reduz o NO₂⁻ a NH₄⁺, de acordo com a seguinte reação geral:



onde Fd_{red} e Fd_{ox} representam a ferredoxina na forma reduzida e oxidada, respectivamente.

Nos cloroplastos, o doador de elétrons para a NiR é a Fd_{red} derivada do transporte de elétrons das reações fotoquímicas da fotossíntese e, nos tecidos não-verdes, a Fd_{red} é originada do NADPH gerado na via das pentoses-fosfato. A NiR consiste de um polipeptídeo monomérico com cerca de 60 a 63 kDa, contendo dois grupos prostéticos: um grupo ferro-enxofre, Fe₄S₄, e um grupo heme especializado. Tais grupos agem em conjunto, ligando-se ao NO₂⁻ e reduzindo-o a NH₄⁺. Existem diversas isoformas dessa enzima nas folhas e raízes, porém todas possuem a mesma estrutura geral (MARSCHNER, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2013). O nitrato e a luz induzem a NiR, enquanto que os aminoácidos glutamina e asparagina a inibem, demonstrando, dessa maneira, que essa enzima e a NR são co-reguladas. Em tabaco, os níveis de mRNA das enzimas NR e NiR flutuaram em uma faixa de ritmo circadiano, com níveis máximos e mínimos de transcritos semelhantes (FAURE *et al.*, 1991).

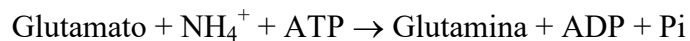
2.5.2 Assimilação do NH₄⁺

Como elevados níveis de NH₄⁺ são tóxicos à célula, as plantas evitam essa toxicidade pela rápida conversão do NH₄⁺ em aminoácidos. A formação de aminoácidos,

amidas e compostos relacionados é a principal via de desintoxicação do excesso de íons NH_4^+ (MARSCHNER, 1995).

A assimilação do NH_4^+ ocorre em diferentes locais nas plantas (folhas, raízes e nódulos radiculares), sendo as enzimas chave envolvidas em todos os casos a sintetase da glutamina (GS) e a sintase do glutamato (GOGAT).

A GS cataliza a condensação, dependente de ATP, do NH_4^+ com o glutamato para formar a glutamina, conforme a reação abaixo:



A GS tem massa molecular de 350 kDa e é composta de oito subunidades aproximadamente idênticas. Essa enzima é muitas vezes encontrada como múltiplas isoenzimas, localizadas no citosol (GS1) e nos plastídios (GS2), as quais possuem papéis distintos (IRELAND; LEA, 1999). A GS1 citosólica desempenha um importante papel na assimilação primária do N nas raízes, e sua função é gerar glutamina para ser transportada pelo xilema. A GS2 cloroplastídica possui um papel crucial na reassimilação do NH_4^+ liberado na fotorrespiração das plantas (WALLSGROVE *et al.*, 1987). Os níveis de carboidratos e a luz alteram a expressão das isoformas dessa enzima presentes nos plastídios, mas apresentam pouco efeito nas formas citosólicas (TAIZ; ZEIGER, 2013). A forma citosólica da GS em folhas é regulada também pós-traducionalmente por fosforilação e interação com a proteína reguladora 14-3-3 (FINNEMANN; SCHJOERRING, 2000)

A glutamina:oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), ou sintase do glutamato, catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato), produzindo duas moléculas de glutamato (MILLER; CRAMER, 2004). As plantas possuem dois tipos de GOGAT: uma, utiliza o NADH como poder redutor (ver reação abaixo) e a outra utiliza a ferredoxina reduzida (LEA, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2013). A reação catalisada pela GOGAT é a seguinte:



A NADH-GOGAT está localizada nos plastídios de tecidos não-fotossintetizantes e está envolvida com a assimilação do NH_4^+ absorvido da rizosfera (BOWSHER *et al.*, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013). A GOGAT dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) é constituída por um único polipeptídeo com massa molecular em torno de 140 a 165 kDa (LEA, 1999), sendo encontrada nos cloroplastos e sua função é assimilar o amônio produzido na fotorrespiração. Altos níveis de glutamina e luz estimulam a atividade da Fd-GOGAT (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Normalmente a raiz é o principal local da assimilação primária de NH_4^+ , sendo a GS1 e a NADH-GOGAT, as isoformas envolvidas nesse processo (ANDREWS *et al.*, 2004; MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010; TABUCHI; ABIKO; YAMAYA, 2007). Contudo, uma significativa quantidade de NH_4^+ pode ser detectada na seiva xilemática de plantas que crescem em condições de altas concentrações desse íon e, dessa maneira, a assimilação primária também pode ocorrer na parte aérea (SCHJOERRING *et al.*, 2002).

Uma vez que o NH_4^+ foi assimilado pelo ciclo GS/GOGAT, o glutamato pode ser rapidamente convertido em outros aminoácidos pela ação das transaminases. Uma dessas enzimas é essencial para a formação de aspartato, a transaminase do glutamato oxaloacetato (GOT), na qual sua reação envolve a transaminação entre glutamato e oxaloacetato, produzindo aspartato e α -cetoglutarato (IRELAND; LEA, 1999). A asparagina é formada através da ação da enzima sintetase da asparagina (AS), a partir do aspartato e da glutamina, com hidrólise simultânea de ATP (TAIZ; ZEIGER, 2013). Nesse caso, a glutamina tem o papel de doador de N para formar o grupo amida.

A assimilação do NH_4^+ em aminoácidos requer uma grande quantidade de esqueletos carbônicos, que são produzidos em outras vias metabólicas, tais como a respiração e a fotossíntese (MOKHELE *et al.*, 2012). Para minimizar os custos de carbono (C), a maior parte do N assimilado é transportado na forma de compostos ricos em N com altas relações N/C, tais como glutamina (2N/5C), asparagina (2N/4C), arginina (4N/3C), dentre outros (MARSCHNER, 1995). Em plantas de tomate, elevadas concentrações de HCO_3^- na rizosfera aumentaram a incorporação de N em aminoácidos nas raízes, em consequência da maior disponibilidade de esqueletos carbônicos anapleróticos nessas plantas (BIALCZYK *et al.*, 2005).

2.6 Respostas das plantas a diferentes fontes de N e à salinidade

Vários fatores estão envolvidos na preferência das plantas pelo suprimento de N (se NO_3^- ou NH_4^+), de modo a conferir maior crescimento e produção. Plantas adaptadas a solos ácidos e com baixo potencial redox, preferem o NH_4^+ , enquanto plantas que crescem melhor em solos com pH alto, preferem o NO_3^- (MARSCHNER, 1995). A preferência da fonte de N em plantas superiores, entretanto, parece estar associada com a forma de nitrogênio inorgânico que prevalece em seu habitat natural. Dessa maneira, pode-se esperar que plantas que crescem em solos alagados, onde o NH_4^+ é a forma de N inorgânico dominante, irão dar preferência a esta forma de N (BRIX; DYHR-JENSEN; LORENZEN,

2002). Como os íons NO_3^- e NH_4^+ compreendem cerca de 80% dos cátions e ânions absorvidos pelas plantas, a forma de suprimento de N tem um grande impacto na absorção de outros ânions e cátions, na regulação do pH celular e do pH da rizosfera (MARSCHNER, 1995).

Ambas as formas de N (NO_3^- ou NH_4^+) exercem vários efeitos no metabolismo e no crescimento das plantas (FORDE, 2002; SCHEIBLE *et al.*, 1997). O crescimento das plantas foi favorecido quando cultivadas com NO_3^- , sendo observado um estímulo no crescimento da parte aérea e um atraso na senescência (SCHEIBLE *et al.*, 1997). Contudo, o efeito negativo apontado para fonte nítrica fornecida isoladamente sobre o desenvolvimento da planta tem relação com o consumo de ATP, pois a energia requerida para a assimilação de um íon NO_3^- é de 20 moléculas de ATP, enquanto que a assimilação de um íon NH_4^+ requer somente 5 moléculas de ATP (KANT *et al.*, 2007).

Em contraste ao NO_3^- , poucas espécies se desenvolvem bem quando o NH_4^+ é fornecido como única ou predominante fonte de N, mesmo com menor requerimento de energia para sua assimilação (BRITTO *et al.*, 2001). Dessa maneira, o NH_4^+ é considerado um nutriente “paradoxal”, pois, embora ele seja uma importante fonte de N e intermediário de diversas reações metabólicas, ele causa sintomas de toxicidade em muitas plantas quando cultivadas em NH_4^+ como fonte exclusiva de N (FRECHILLA *et al.*, 2001; GERENDÁS *et al.*, 1997; HOLZSCHUH *et al.*, 2011). Li *et al.* (2012), listaram alguns mecanismos que explicam a toxicidade do NH_4^+ , os quais incluem: distúrbios no pH intracelular, desacoplamento da fotofosforilação, aumento do consumo de esqueletos de C nas raízes e ciclagem fútil transmembranar de NH_4^+ com intenso gasto de energia. Esse último se refere a um elevado gasto energético necessário para bombear o excesso de NH_4^+ para fora da célula (BRITTO *et al.*, 2001).

A mudança no pH citosólico, associada à toxicidade do NH_4^+ , ocorre devido a liberação de H^+ a partir do NH_4^+ durante a sua assimilação em aminoácidos (MILLER; CRAMER, 2004). Além desses, outro sintoma de toxidez é o desequilíbrio iônico, no qual ocorre a redução da concentração de cátions essenciais (Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+}) e aumento da concentração de ânions orgânicos (ácido carboxílico) e inorgânicos (Cl^- , SO_4^{2-} e PO_4^{2-}) (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; BRITTO; KRONZUCKER, 2002; MILLER; CRAMER, 2004). Em adição, o NH_4^+ inibe não só a absorção de K^+ , como também seu acúmulo e redistribuição (BALKOS; BRITTO; KRONZUCKER 2010; SHAVIV *et al.*, 1990; TEN HOOPEN *et al.*, 2010). Dessa maneira, parece razoável que plantas nutridas com NH_4^+ necessitem mais de K^+ do que aquelas nutridas com NO_3^- .

Embora a absorção de muitos cátions seja reduzida sob nutrição de NH_4^+ , a absorção desse íon é tão alta que geralmente plantas cultivadas com NH_4^+ acumulam um excesso de cátions em relação aos ânions (BRITTO; KRONZUCKER, 2002). Como consequência dessa alta absorção do NH_4^+ , a rizosfera acidifica-se, já que para manter o balanço de cargas dentro da planta, ocorre um efluxo de prótons, a fim de restabelecer o potencial elétrico negativo da membrana plasmática. Em contrapartida, plantas crescendo na presença de NO_3^- promovem a alcalinização do meio, provavelmente em resposta da troca eletroneutra deste ânion por íons hidroxila (BRITTO; KRONZUCKER, 2002).

Adicionalmente, plantas nutridas com NH_4^+ apresentam redução drástica no crescimento, clorose nas folhas, maiores relações parte aérea:raiz e maiores taxas respiratórias (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013; BRITTO; KRONZUCKER, 2002). Também, em geral, apresentam menores taxas transpiratórias, menor eficiência no uso da água (ZHANG *et al.*, 2010) e menor eficiência no uso do nitrogênio (EUN) (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013). Outro fator comum a essas plantas é o maior acúmulo de aminoácidos em comparação às plantas nutridas com NO_3^- , porém esse acúmulo não pode ser diretamente relacionado com um sintoma de toxidez, já que isso foi observado mesmo quando o NH_4^+ não reduziu o crescimento (BRITTO; KRONZUCKER, 2002; MAHMOOD; KAISER, 2003; MIRANDA *et al.*, 2013).

No entanto, os sintomas de toxicidade do NH_4^+ podem ser aliviados pela nutrição combinada com o NO_3^- . Além disso, a nutrição combinada pode induzir uma resposta sinérgica de crescimento que pode ultrapassar as taxas de crescimento máximas encontradas quando as plantas são nutridas com uma fonte única de N (NO_3^- ou NH_4^+) (BRITTO; KRONZUCKER, 2002; GUO; ZU; TANG, 2012; HOLZSCHUH *et al.*, 2011; KANT *et al.*, 2007).

Uma fertilização nitrogenada adequada não somente promove o crescimento das plantas, como também pode reduzir os efeitos da salinidade (FLORES *et al.*, 2001). Alguns autores verificaram que um maior suprimento de N pode reduzir os efeitos deletérios do estresse salino (GRATTAN; GRIEVE, 1999; TABATABAEI, 2006).

As respostas do crescimento, da absorção de íons e das enzimas de assimilação do N à fertilização nitrogenada, sob condições salinas e não salinas, variam de acordo com a fonte de N (NO_3^- ou NH_4^+) e dependem também da espécie vegetal (GUO; ZU; TANG, 2012; KANT *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2011). Plantas de ervilhas foram mais tolerantes à salinidade quando foram nutridas com NO_3^- como única fonte de N (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005). Contudo, várias glicófitas apresentaram maior sensibilidade aos sais

somente quando o NH_4^+ estava presente no meio de cultivo (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; FEIJÃO, 2009; FRECHILLA *et al.*, 2001), ao passo que a halófito *S. alterniflora* apresentou melhor crescimento em condições de alta salinidade quando foram nutridas com NH_4^+ (HESSINI *et al.*, 2013). Entretanto, nenhum efeito da forma de N foi observado na tolerância de plantas de soja e *Leptochloa fusca* ao estresse salino (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992). Em adição a esses dados, o efeito sinérgico no crescimento observado quando as plantas são nutrição com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ é mais pronunciado quando as plantas estão sob condições de estresse (KANT *et al.*, 2007; REDDY; APTE; THOMAS, 1989; TANG *et al.*, 2011).

No que concerne às relações iônicas, plantas de trigo, nutridas com NH_4^+ , foram mais sensíveis aos sais, quando comparadas com as nutridas com NO_3^- , devido à inibição da absorção de K^+ e Ca^{2+} . Além disso, não foi observada uma competição entre os íons Na^+ e NH_4^+ , havendo uma promoção da absorção de Na^+ nas plantas nutridas com NH_4^+ , particularmente em condições de estresse salino (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001). Contudo, em cevada, foi observado um maior decréscimo no conteúdo de Na^+ nas diversas partes das plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em comparação com as nutridas com somente NO_3^- . Entretanto, esse decréscimo no acúmulo de Na^+ foi apenas ligeiramente relacionado com a redução dos efeitos deletérios da salinidade encontrada nesse regime de N (KANT *et al.*, 2007).

A toxicidade encontrada em algumas plantas nutridas com NH_4^+ pode estar indiretamente relacionada a uma deficiência de K^+ que surge a partir da competição entre os íons K^+ e NH_4^+ pelos mesmos sítios de absorção na membrana plasmática das raízes (SHAVIV *et al.*, 1990). Em plantas de ervilha, trigo e azevém, a concentração de K^+ foi reduzida em plantas nutridas com NH_4^+ , tanto em condições controle como de salinidade (FRECHILLA *et al.*, 2001; IRSHAD *et al.*, 2002; KANT *et al.*, 2007).

Sob condições de salinidade, o NH_4^+ estimula o influxo de Cl^- , aumentando a toxicidade associada com o acúmulo deste íon (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005). Em *Leptochloa fusca*, sob condições de salinidade, as plantas nutridas com NH_4^+ absorveram mais Cl^- do que as nutridas com NO_3^- (MAHMOOD; KAISER, 2003). Em ervilha, os teores de Cl^- também foram maiores nas plantas nutridas com NH_4^+ , porém esses teores foram menos afetados pela salinidade quando comparados com os das plantas nutridas com NO_3^- (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005; FRECHILLA *et al.*, 2001). Em contraste, em plantas nutridas com NO_3^- , a absorção e o acúmulo de Cl^- são frequentemente inibidos pelo NO_3^- , não somente devido a seu efeito no pH, mas também pela competição entre o NO_3^- e o Cl^- que

parece ser decisiva para a menor absorção e transporte de Cl^- em condições de salinidade (ARAGÃO *et al.*, 2010; BARHOUMI *et al.*, 2010; FEIJÃO *et al.*, 2013; FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005; MAHMOOD; KAISER, 2003).

Em condições de salinidade, a nutrição de NO_3^- como única fonte de N pode resultar em uma menor absorção e disponibilidade de N (GHANEM *et al.*, 2011). Quando ambos, NO_3^- e NH_4^+ , são fornecidos, a homeostase no pH pode ser alcançada através de taxas similares de produção de H^+ (assimilação de NH_4^+) e consumo de H^+ (assimilação de NO_3^-) e, assim, reduzindo o requerimento de energia. Isto pode explicar, pelo menos em parte, o melhor crescimento observado na maioria das plantas sob nutrição combinada de N (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005; GRATTAN; GRIEVE, 1994).

Plantas cultivadas em soluções contendo NH_4^+ tem uma maior quantidade de compostos nitrogenados (N-aminossolúveis, aminoácidos e proteínas) em comparação com as nutridas com NO_3^- , como única fonte de N (GUO; ZU; TANG, 2012). Diversas funções são propostas para estes compostos em condições de salinidade, das quais podemos destacar: ajustamento osmótico, proteção de macromoléculas, fonte de N, esqueletos de C e energia, manutenção do pH celular e atenuação dos efeitos do estresse oxidativo (PARIDA; DAS, 2005).

A assimilação do NO_3^- , de fato, requer mais energia do que a do NH_4^+ , haja vista que o NO_3^- deve ser reduzido a NH_4^+ , para somente então ser incorporado em compostos orgânicos. Nesse sentido, Kant *et al.* (2007) sugeriram que a economia de energia para a assimilação de N quando utiliza-se a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ pode reservar mais recursos energéticos para serem utilizados nos mecanismos de tolerância ao estresse salino. Contudo, Zerihum, McKenzie e Morton (1998) demonstraram que o custo energético para a assimilação do NO_3^- não é substancialmente maior que aquela para o NH_4^+ , visto que o NO_3^- pode contribuir para o potencial osmótico, enquanto que o NH_4^+ leva ao efluxo de H^+ no meio, sendo preciso haver, dessa forma, a regulação do pH intracelular.

Os efeitos deletérios da salinidade sobre o metabolismo do N podem ser atribuídos ao decréscimo da absorção de N, decréscimo das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do N, alteração na síntese de aminoácidos e aumento na atividade de enzimas hidrolíticas, tais como RNase, DNase, protease, dentre outras, levando à degradação de macromoléculas (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; GRATTAN; GRIEVE, 1994; NATHAWAT *et al.*, 2005; NGUYEN *et al.*, 2005). Entretanto, o efeito da salinidade no metabolismo do N depende da fonte de N (EHLTING *et al.*, 2007; NATHAWAT *et al.*, 2005). Maiores atividades da NR e da NiR são observadas em plantas cultivadas na presença de NO_3^- , tanto

em condições controle como de salinidade, pois esse íon induz a atividade dessas enzimas pelo aumento na expressão de seus genes (EHLTING *et al.*, 2007; NASRAOUI-HAJAJIA *et al.*, 2011; NATHAWAT *et al.*, 2005). Em plantas de *C. roseus*, a salinidade inibiu a atividade da GS nas folhas e a possível razão é que uma boa parte do glutamato tenha sido convertida em prolina ou arginina para o ajustamento osmótico. De maneira contrária, nas raízes dessas plantas, a atividade da GS foi ativada pela salinidade e/ou nutrição com NH_4^+ (TANG *et al.*, 2011). Bourgeais-Chaillou, Perez-Allfocea e Guerrier (1992) encontraram maiores atividades da GS, da GOGAT e da GDH nas plantas nutridas com NH_4^+ e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ do que nas nutridas apenas com NO_3^- , tanto em condições controle, como de salinidade. Este fato trouxe consequências para o ajustamento osmótico, pois o aumento da GS levou a uma maior formação de glutamina e à biossíntese de outros solutos orgânicos, enquanto o aumento da GDH proveu glutamato e/ou α -cetoglutarato para a síntese de clorofila e de aminoácidos (principalmente prolina).

2.7 O Girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma planta da família Asteraceae, sendo originária da América do Norte, mais precisamente do México, e atualmente é cultivada em todos os continentes (FARIAS *et al.*, 2002). Apresenta grande adaptação a diferentes condições ambientais, ocupando diversos habitats, como regiões tropicais, subtropicais e temperadas (CASTRO; FARIAS, 2005; LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005). Possui ciclo vegetativo relativamente curto, variando entre 90 e 130 dias e o florescimento ocorre, em média, 60 dias após a semeadura (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005). Devido à etimologia da palavra e a sua intrigante rotação sempre voltada para o sol (heliotropismo), o girassol também é conhecido como “flor do sol”.

A cultura do girassol se apresenta como a quinta oleaginosa em produção de matéria-prima no mundo, ficando atrás somente das culturas de soja, canola, algodão e amendoim. É também considerada a quarta oleaginosa em produção de farelo, vindo depois da soja, canola e algodão e a terceira em produção mundial de óleo, depois, apenas da soja e da canola (GAZOLLA *et al.*, 2012). Atualmente, a Rússia é o maior produtor seguido da Ucrânia e da Argentina. O Brasil, apesar do enorme potencial, ocupa apenas a 27ª posição (FAO, 2011), sendo os maiores produtores os estados de Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás, que juntos concentram quase 80% do total produzido no país (CONAB, 2013).

A importância da cultura do girassol tem aumentado no cenário agrícola nacional e internacional, por ser uma planta de múltiplos usos e da qual quase tudo se aproveita. Essa cultura pode ser usada como matéria-prima para silagem e forragem, adubação verde e ornamentação (UNGARO *et al.*, 2009). Em adição, pode ainda se apresentar como mais uma opção nos sistemas de rotação e sucessão de culturas, como reciclador de nutrientes e com potencial alelopático às plantas invasoras, melhorando as características físicas do solo (UNGARO, 2000). Além disso, suas sementes podem ser utilizadas para fabricação de ração animal e extração de óleo de alta qualidade para consumo humano ou como matéria-prima para a produção de biodiesel (PORTO; CARVALHO; PINTO, 2007). O óleo de girassol destaca-se entre os demais óleos por suas excelentes características físico-químicas e nutricionais. Possui alta relação de ácidos graxos poliinsaturados (65,3%) e saturados (11,6%), sendo que o teor de poliinsaturados é constituído, em grande parte, pelo ácido linoléico (65%). Por essas características, é um dos óleos vegetais de melhor qualidade nutricional e organoléptica do mundo (CASTRO *et al.*, 1997). Além disso, a massa resultante da extração do óleo rende uma torta altamente proteica, a qual é usada na produção de ração e silagem para alimentação animal. Em adição, o cultivo desta planta ainda pode estar associado à apicultura, o que permite uma produção de 30 a 40 kg de mel por hectare (LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005).

Além de maior tolerância à seca, frio e calor, o girassol foi classificado como espécie moderadamente tolerante à salinidade, quando comparada com outras culturas (KATERJI *et al.*, 2000; LEITE; BRIGHENTI; CASTRO, 2005). Contudo, os efeitos da salinidade nessa espécie variam com o genótipo e o estágio de desenvolvimento, bem como com a duração e a intensidade do estresse (ASHRAF, 1999; AZEVEDO NETO *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2010; JABEEN; AHMAD, 2013; NOBRE *et al.*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e as análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará. Sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), variedade Catissol, foram selecionadas e, em seguida, desinfestadas durante 5 minutos com hipoclorito de sódio a 0,7%. Depois disso, as sementes foram exaustivamente lavadas com água destilada, para a retirada do hipoclorito, e, por fim, foram semeadas em copos plásticos descartáveis (200 mL), contendo vermiculita umedecida com água destilada.

Decorridos oito dias da semeadura, as plântulas, após serem selecionadas com base no critério de uniformidade, foram transferidas para bandejas contendo 10 L de solução nutritiva de Hoagland modificada (diluída 1:2), contendo como fonte de N apenas NO_3^- , a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, na proporção 3:1, ou apenas NH_4^+ ; em todos os casos, a concentração final de N foi igual a 6 mM (Tabela 1).

Tabela 1. Composição dos macronutrientes nas soluções nutritivas para os diferentes tratamentos de N.

Sais	Concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (mM)		
	6/0	4,5/1,5	0/6
KNO_3	2,0	1,0	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2,0	1,0	—
NO_3NH_4	—	1,5	—
KCl	—	1,0	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	—	2,0
K_2SO_4	—	—	1,0
KH_2PO_4	1,0	1,0	1,0
MgSO_4	0,5	0,5	0,5
CaCl_2	—	1,0	2,0
NH_4Cl	—	—	2,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Após seis dias nas condições acima, as plantas foram novamente selecionadas com base na uniformidade e transferidas para baldes (duas plantas/balde) contendo 6 L da respectiva solução de cultivo. Nesse mesmo dia, foi iniciada a adição de NaCl, que foi realizada em parcelas de 25 mM por dia, até se atingir a concentração final de 75 mM. Diariamente o volume da solução foi completado com água destilada e o seu pH, mantido

entre 5,0 e 6,0, pela adição de NaOH ou HCl a 1 N; cada solução foi trocada por uma nova a cada cinco dias. Durante o período experimental, as medidas de temperatura e de umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foram registradas diariamente com um termohigrógrafo, sendo observados os valores médios de $28,5 \pm 0,63$ °C e $75,5 \pm 1,98\%$, respectivamente.

3.2 Coleta e análise de crescimento

As coletas foram realizadas aos 7 e aos 14 dias do final da adição de sal, sempre entre 10 h e 12 h, ocasião em que as plantas foram divididas em folhas, caules e raízes, e se determinou a área foliar (LI 3100, Area Meter, Li-Cor., In. Lincoln, Nebraska, USA). O primeiro par de folhas mais jovens completamente expandidas, a partir do ápice, e o terço distal das raízes foram retirados de cada uma das duas plantas de cada balde e foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo armazenados a -80 °C até posterior utilização. O restante do material coletado foi, então, congelado a -20 °C e, em seguida, liofilizado. Após esse processo de secagem, foram determinadas as massas secas das folhas, caules e raízes. O material liofilizado foi pulverizado com nitrogênio líquido e o pó obtido foi armazenado em frascos de vidro a -20 °C até sua utilização nas análises bioquímicas.

3.3 Trocas gasosas

As medidas de fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (g_s) e concentração interna de CO₂ (C_i) foram realizadas no período da manhã (entre 9 e 11 h), utilizando-se, para isso, um analisador de gás no infravermelho (IRGA, mod. LI-6400XT, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA), acoplado a uma fonte de radiação artificial (LED 6400-02) com intensidade ajustada a $1.200 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$. As determinações foram feitas no primeiro par de folhas completamente expandidas, a partir do ápice. De posse desses dados, foram mensuradas a eficiência no uso de água (EUA), por meio da razão entre A e E , e a eficiência instantânea de carboxilação, através da razão entre A e C_i .

3.4 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Os teores das clorofilas a e b , das clorofilas totais e dos carotenóides foram determinados através do método descrito por Wellburn (1994). Três discos medindo 1,0 cm

de diâmetro foram retirados do primeiro par de folhas completamente expandidas e colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturada com CaCO_3 , os quais foram previamente revestidos com papel alumínio e permaneceram tampados durante toda a análise. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65 °C, em banho-maria, por 30 min. Decorrido esse tempo, e após terem atingido a temperatura ambiente, os discos foliares foram reservados e o extrato de pigmentos foi utilizado para a determinação da absorbância a 665, 649 e 480 nm. Por fim, os discos foliares foram lavados, para a retirada do excesso de solução, e secos a 60 °C, por 48 h, em estufa, para a obtenção de sua massa seca. Os teores de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b), clorofila total (C_t) e carotenoides foram calculados com base nas seguintes equações:

$$C_a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$C_b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$C_t = (7,15 \times A_{665}) + (18,71 \times A_{649});$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220,$$

em que A representa a absorbância em um respectivo comprimento de onda, sendo expressos em mg g^{-1} MS.

3.5 Determinação de antocianinas

Para a determinação de antocianinas, foram utilizados dez discos foliares com 1,0 cm de diâmetro (aproximadamente 150 mg), os quais foram retirados do par mais jovem de folhas completamente expandidas. Esses discos foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL de uma mistura composta por solução de HCl a 3 M, água desionizada e metanol absoluto, na proporção de 1:3:16 (v:v:v). Em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação constante e suave, a 4 °C, no escuro, por 48 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a $3000 \times g$, por 10 min, a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da absorbância a 530 e 653 nm. Os teores de antocianinas foram obtidos através da seguinte equação, proposta por Murray e Hackett (1991):

$$\text{Teores de antocianinas} = A_{530} - (0,24 \times A_{653}),$$

em que A representa a absorbância em um respectivo comprimento de onda, sendo expressos em mmol g^{-1} MF.

3.6 Mensuração dos danos oxidativos

3.6.1 Vazamento de eletrólitos

O grau de integridade das membranas foi estimado pelo vazamento de eletrólitos (VE), como descrito por Singh *et al.* (2007). Amostras de folhas (discos com 0,5 cm de diâmetro) e de raízes (cerca de 100 mg do terço distal) foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de água desionizada e mantidas em repouso, à temperatura ambiente, por 2 h. Decorrido esse tempo, a condutividade elétrica inicial (C_1) do extrato foi medida, utilizando-se um condutivímetro, e ao término desse processo, os tubos contendo as amostras foram aquecidas a 95 °C, por 30 min, em banho-maria. Após alcançarem a temperatura ambiente, a condutividade elétrica do extrato (C_2) foi novamente medida. O VE foi estimado através da seguinte equação: $VE (\%) = (C_1/C_2) \times 100$.

3.6.2 Determinação da peroxidação dos lipídios

A peroxidação dos lipídios foi inferida através da quantificação dos teores de malondialdeído (MDA), um produto dessa reação, como descrito previamente por Buege e Aust (1978). Amostras congeladas de folhas ou raízes (300 mg) foram pulverizadas com nitrogênio líquido, e, em seguida, homogeneizadas com 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (m/v), a 4 °C. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a $12.000 \times g$, por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante obtido, imediatamente utilizado na análise. Em tubos de ensaio, foram adicionados volumes iguais de extrato e de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,5% (m/v), preparada em TCA a 20% (m/v). Logo após, a mistura foi aquecida a 95 °C, durante 30 min, em banho-maria, e, após esse tempo, resfriada rapidamente em banho de gelo. Em seguida, a mistura foi centrifugada a $3.000 \times g$, por 10 min, e o sobrenadante obtido, utilizado para a determinação da absorbância a 535 nm (específica) e a 600 nm (não específica). Os teores de MDA foram estimados após a subtração entre essas duas leituras de absorbância e utilizando o seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 0,155 M^{-1} cm^{-1}$), sendo expressos em $nmol g^{-1} MF$.

3.7 Determinação dos teores de íons inorgânicos

Os teores de Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- e NH_4^+ foram determinados nas diferentes partes das plantas. Os extratos brutos foram preparados como descrito por Rinne *et al.* (2012), com pequenas modificações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 50 mg do pó liofilizado de folhas, colmos ou raízes e 5 mL de água desionizada. As amostras foram então agitadas vigorosamente e incubadas a 85 °C, por 30 min, em banho-maria. Ao final desse período, as amostras foram novamente agitadas e deixadas em repouso por 30 min, sendo, em seguida, centrifugadas a $4.000 \times g$, por 20 min, à temperatura ambiente. Por fim, o sobrenadante (extrato) foi coletado, filtrado em papel de filtro e armazenado em frascos de vidro a -20 °C, até sua utilização.

Os teores de Na^+ e de K^+ foram determinados por fotometria de chama (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989). Os teores de Cl^- foram determinados segundo o método de Gaines, Parker e Gascho (1984). Para isso, em tubos de ensaio, foram adicionados 1,5 mL do extrato convenientemente diluído e 0,25 mL da mistura de reação, composta por soluções de $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ a 13,2 mM (preparada em metanol absoluto) e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a 20,2% (preparada em água desionizada), na proporção 4:1. Os tubos foram agitados vigorosamente e mantidos em repouso por 15 min, e, após esse tempo, procedeu-se à leitura de absorbância a 460 nm. Os teores de Cl^- foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de NaCl.

Os teores de NO_3^- foram determinados através do método do ácido salicílico (CATALDO *et al.*, 1975). A 100 μL do extrato convenientemente diluído, foram adicionados 200 μL de ácido salicílico a 5%, preparado em ácido sulfúrico concentrado. Depois de 20 min em repouso, foram adicionados 4,7 mL de NaOH a 2 M, seguido por agitação vigorosa, e após atingirem a temperatura ambiente, procedeu-se à leitura de absorbância a 410 nm. Os teores de NO_3^- foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de KNO_3 .

Os teores de NH_4^+ livre foram determinados pelo método do fenolato-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967). A 400 μL do extrato convenientemente diluído, foram adicionados 2,5 mL de solução de fenol a 5%, contendo nitroprussiato de sódio a 0,005%, e 2,5 mL de solução de NaOH a 0,5%, contendo hipoclorito de sódio a 0,06%. Após a adição de cada solução, os tubos foram agitados vigorosamente e, ao final, foram incubados a 37 °C, por 20 min, em banho-maria. Após esse tempo, procedeu-se à leitura de absorbância a 625

nm. Os teores de NH_4^+ foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Os teores dos íons foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS e representam a média de quatro repetições. De posse dos teores de cada íon inorgânico, foram calculadas as eficiências de absorção (EA) (SWIADER; CHYAN; FREIJI, 1994) e de transporte (ET) (LI; McKEAND; ALLEN, 1991), como se segue: $\text{EA} = [\text{conteúdo do íon na planta } (\mu\text{mol})]/[\text{massa seca das raízes (g)}]$ e $\text{ET} = [\text{conteúdo do íon na parte aérea } (\mu\text{mol})]/[\text{conteúdo do íon na planta } (\mu\text{mol})]$.

3.8 Determinação dos íons na seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada no período da manhã (entre 10 e 12 h), de acordo com Shabala *et al.* (2010). Com o auxílio de um estilete, foi feito um corte em bisel no caule, a 3 cm do colo, separando-se a parte aérea das raízes. A raiz foi então acondicionada em uma câmara de pressão tipo Scholander, mantendo-se a extremidade cortada do caule para fora. Em seguida, nitrogênio gasoso foi lentamente introduzido na câmara até atingir a pressão necessária (0,5 a 1 MPa) para a exsudação da seiva, a qual foi coletada imediatamente com o auxílio de uma micropipeta. Os exsudatos foram armazenados em microtubos, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até sua utilização. Na seiva do xilema, determinaram-se as concentrações de NO_3^- e NH_4^+ , como descrito no item 2.7, sendo expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

3.9 Determinação de N-aminossolúveis

Para a obtenção dos extratos, amostras de 25 mg do pó liofilizado de folhas, caules e raízes foram homogeneizados com 2,5 mL de etanol a 80%. Em seguida, o homogeneizado foi mantido a $75\text{ }^\circ\text{C}$, por 1 h, em banho-maria, sendo agitado a cada 15 min. Transcorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a $3.000 \times g$, por 10 min, a $4\text{ }^\circ\text{C}$, e o sobrenadante obtido foi reservado. O processo de extração foi repetido por mais duas vezes, partindo-se sempre do precipitado restante, sob as condições descritas anteriormente, com exceção do tempo, que foi reduzido para 30 min. Ao final do processo, os sobrenadantes coletados foram reunidos e tiveram seu volume completado para 10 mL com etanol a 80%, sendo, em seguida, armazenados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até a sua utilização. O precipitado final foi guardado para a extração do amido.

Os teores de N-aminossolúveis foram determinados de acordo com o método de Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL do extrato convenientemente diluído, 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de cianeto de potássio (KCN) a 0,2 mM, preparado em metilcelosolve absoluto, e 0,1 mL de ninhidrina a 5%, preparado em metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados vigorosamente e aquecidos a 95 °C, durante 20 min, em banho-maria. Decorrido esse tempo, a reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo. Após resfriamento, adicionou-se aos tubos 0,65 mL de etanol a 60%, e se procedeu à leitura de absorvância a 570 nm. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de glicina, sendo expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

3.10 Determinação de aminoácidos

O extrato para a determinação dos aminoácidos (glutamato, aspartato, glutamina, asparagina e serina) foi obtido como descrito por Bielecki e Turner (1966), com pequenas modificações. Amostras de 50 mg do pó liofilizado de folhas foram homogeneizadas com 1 mL da mistura extratora, composta por metanol, clorofórmio e água ultrapura Milli-Q[®], na proporção 12:5:3 (v:v:v), em almofariz previamente resfriado com nitrogênio líquido. O homogeneizado foi centrifugado a $16.000 \times g$, a 4 °C, durante 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e o precipitado, ressuspensionado novamente em 1 mL da mistura extratora, seguido de centrifugação sob as condições descritas anteriormente; após isso, os sobrenadantes foram reunidos (cerca de 2,0 mL). Em seguida, foram acrescentados 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água ultrapura Milli-Q[®] ao extrato. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 24 horas, a 4 °C, para separação de fases. A fase superior (aquosa) foi cuidadosamente coletada com auxílio de pipeta Pasteur e concentrada por evaporação, em banho-maria a 40 °C, por 24 h, até se obter aproximadamente 1 mL de seu volume. Ao final do processo, as amostras foram filtradas por meio de membrana em politetrafluoretileno (PTFE), com poro de 0,2 μm de diâmetro, e armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

A separação e a análise dos aminoácidos foi realizada através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa, após derivatização com *O*-ftaldialdeído (OPA), conforme Puiatti e Sodek (1999). A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com o solvente A [fosfato de sódio dibásico a 50 mM, pH 7,25, contendo acetato de sódio a 50 mM, tetrahidrofurano a 2% (v/v) e metanol a 2% (v/v)] e o

solvente B (metanol a 65%). Ambas as soluções foram desaeradas, e o solvente A foi filtrado à vácuo em filtro Millipore[®], por meio de membrana em fluoreto de polivinilideno (PVDF), com poro de 0,45 µm de diâmetro.

O reagente de derivatização foi preparado dissolvendo-se, inicialmente, 50 mg de OPA em 1 mL de metanol que, posteriormente, foi misturado a 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (ácido bórico 2,4% m/v, em água ultrapura Milli-Q[®]; pH ajustado com NaOH a 2 N) e filtrado através de membrana em PTFE com poro de 0,2 µm de diâmetro. No dia de uso, 5 µL de 2-mercaptoetanol foram adicionados a cada 625 µL dessa mistura. Para a derivatização, 300 µL do reagente OPA + mercaptoetanol foram adicionados a 100 µL do extrato, em um *vial* de 1,5 mL e, em seguida, agitado. Após 2 min de reação, tempo suficiente para formar os derivados aminoácido-OPA, uma alíquota de 20 µL foi injetada no HPLC (Sistema HPLC, Shimadzu, Japão), através do seu injetor automático (mod. SIL-20A, Shimadzu). Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura através da coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈ (Hypersil ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm, Thermo Scientific), a 30 °C, com fluxo de 0,8 mL/min, através de um gradiente entre os solventes A e B, o qual foi estabelecido pelo aumento gradativo do solvente B em relação ao solvente A, da seguinte maneira: 20%, aos 0 min; 28%, aos 5 min; 58%, aos 35 min; 75%, aos 40 min; 92%, aos 56 min; 96%, aos 60 min; e 100%, aos 61 min. Ao passar pela coluna cromatográfica, os derivados aminoácido-OPA foram detectados por um monitor em ultravioleta (mod. SPD – 20A, Shimadzu), ajustado com comprimento de onda a 240 nm. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados e comparadas a partir de uma curva padrão previamente preparada, utilizando reagentes ultrapuros (Sigma). Os resultados dos teores de cada aminoácido foram expressos em µmol g⁻¹ MS.

Os extratos utilizados para a determinação de prolina foram os mesmos empregados para a dos teores de íons. Os teores de prolina livre foram determinados de acordo com Bates, Waldren e Teare (1973). Em uma alíquota de 0,5 mL do extrato bruto, foram adicionados 0,5 mL de ninhidrina ácida e 0,5 mL de ácido acético glacial. Para um total de 50 amostras, a ninhidrina ácida foi preparada dissolvendo-se 1,25 g de ninhidrina em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico a 6 M. Os tubos de ensaio foram tampados e, após serem vigorosamente agitados, foram aquecidos a 95 °C por 1 h, em banho-maria. Decorrida esse tempo, a reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de gelo. Após o resfriamento, em cada tubo, foram adicionados 2,0 mL de tolueno. Após agitação vigorosa da solução, e conseqüente formação de uma solução bifásica, a fase orgânica foi aspirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e submetida à leitura de

absorbância em 520 nm, sendo o tolueno utilizado como branco. Os teores de prolina livre foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de prolina, sendo expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

3.11 Determinação do nitrogênio total

Os teores de nitrogênio total foram determinados de acordo com o método descrito por Baethgen e Alley (1989). Cerca de 50 mg do pó liofilizado de folhas, colmos e raízes foram colocados em tubos digestores contendo 1,10 g da mistura catalisadora, composta por sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio, na proporção de 1:0,1:0,01 e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados em um bloco digestor, no qual a temperatura foi elevada gradualmente até 350 °C, a fim de que se processasse a mineralização das amostras. Ao final desse processo, quando as amostras apresentavam-se como uma solução de cor verde e sem resíduos de material não digerido, o conteúdo de cada tubo digestor foi ressuspensionado com água desionizada e o volume, aferido para 25 mL em um balão volumétrico. Em tubos de ensaio, foram adicionados 200 μL do extrato convenientemente diluído com solução diluente (preparada a partir da dissolução de 22 g da mistura catalisadora em 1,0 L de H_2SO_4 a 1,1 M). Em seguida, foram adicionados 1,1 mL de uma solução composta por fosfato de sódio dibásico a 0,1 M, tartarato de sódio e potássio a 5% e hidróxido de sódio (NaOH) a 5,4%, além de 0,8 mL de uma solução de salicilato de sódio a 15%, contendo nitroprussiato de sódio a 0,03% e, por fim, 0,4 mL de hipoclorito de sódio a 0,31%. Os tubos foram agitados à medida que cada reagente foi adicionado, e ao final foram mantidos a 37 °C, por 15 min, em banho-maria. Após esse tempo, procedeu-se à leitura de absorbância a 650 nm. Os teores de nitrogênio total foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo expressos em mg g^{-1} MS. De posse dos teores de nitrogênio total, foi calculada a eficiência de utilização de nitrogênio pela planta, como se segue: $\text{EU}_\text{N} = [\text{massa seca da planta (g)}]^2 / \{\text{conteúdo de N na planta (g)} \times [\text{massa seca total (g)} / 1000]\}$.

3.12 Determinação dos carboidratos solúveis

Os extratos utilizados para esta determinação foram os mesmos empregados para a dos teores de íons. Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). A 0,4 mL do extrato convenientemente diluído foram adicionados 0,4 mL de fenol

a 5% e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 10 min para o seu resfriamento. Em seguida, procedeu-se à leitura de absorvância a 490 nm. Os teores de carboidratos solúveis foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de D(+) glicose anidra, sendo expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

3.13 Determinação de amido

A extração e a determinação de amido em folhas, caules e raízes foram realizadas como descrito por Hodge e Hofreiter (1962). No precipitado remanescente da extração de N-aminossolúveis, foram adicionados 2,0 mL de ácido perclórico (HClO_4) a 30% (v/v), sendo os tubos mantidos sob agitação constante, por 20 min, com o auxílio de uma mesa agitadora, com movimentos orbitais a 45 rpm. Logo após, foram adicionados 1,67 mL de água desionizada em cada um dos tubos, seguido por centrifugação a $3.000 \times g$, por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido a mais duas extrações, como descrito acima. Ao final das extrações, os sobrenadantes foram reunidos e tiveram seu volume completado para 25 mL com água desionizada em balão volumétrico.

Para a determinação do amido, foram adicionados em tubos de ensaio, 0,5 mL do extrato e 2,5 mL de uma solução de antrona a 0,14% (m/v), preparada em H_2SO_4 a 14 M. Os tubos foram mantidos a 95°C , por 10 min, em banho-maria. Decorrido esse tempo, a reação foi interrompida pela colocação dos tubos em banho de gelo. Após atingirem a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas a leituras de absorvância a 620 nm. Os teores de amido foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de D(+) glicose anidra, sendo expressos em μmol de equivalente de glicose g^{-1} MS.

3.14 Atividades enzimáticas

3.14.1 Redutase do nitrato

A atividade *in vivo* da redutase do nitrato (NR) foi determinada de acordo com o método de Silveira *et al.* (1998), com pequenas modificações, que consiste da infiltração de uma solução contendo nitrato no tecido e da dosagem subsequente do nitrito produzido, o qual se difunde no meio de incubação. Amostras de aproximadamente 100 mg de discos foliares (0,5 cm de diâmetro) e 500 mg de raízes foram colocados em tubos de ensaio

contendo 5 mL do meio de incubação (tampão fosfato de potássio a 0,1 mM, pH 7,5, contendo KNO₃ a 50 mM, isopropanol a 1% (v/v) e cloranfenicol a 15 mg/L). Em seguida, os tubos foram fechados, envoltos em papel de alumínio e submetidos à vácuo por 2 min, para infiltração da solução no tecido, sendo o vácuo desfeito e refeito por mais 2 min. Após esse processo, as amostras foram incubadas no escuro a 30 °C, por 30 min, em banho-maria. A concentração de nitrito (NO₂⁻) produzido pela NR foi determinada colorimetricamente pela adição de 0,5 mL de sulfanilamida a 1% (m/v), preparada em HCl a 2,4 M, e 0,5 mL de *N*-naftil-etilenodiamina a 0,02% (m/v) a 1 mL do meio de incubação, seguida de leituras de absorvância a 540 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de NaNO₂. A atividade da NR foi expressa em nmol NO₂⁻ min⁻¹ g⁻¹ MF.

3.14.2 Redutase do nitrito

O extrato para a determinação da NiR foi preparado de acordo com Kant *et al.* (2007), com pequenas modificações. Amostras do tecido congelado de folhas ou raízes (1 g) foram pulverizadas em almofariz, utilizando nitrogênio líquido, e, em seguida, homogeneizadas com tampão de extração, composto por Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ a 5 mM, glicerol a 10%, ditioneitol (DTT) a 5 mM, Triton-X-100 a 0,05%, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 1 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) a 1%. O homogeneizado foi filtrado em tela de náilon, sendo, em seguida, centrifugado a 16.000 × g, durante 30 min, a 4 °C. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C e o sobrenadante (extrato) foi congelado e mantido a -80 °C até sua utilização.

A atividade da NiR foi determinada de acordo com o método descrito por Datta e Sharma (1999). O meio de reação (volume final de 2 mL) foi composto de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,5, NaNO₂ a 2 mM, metilviologênio a 2 mg/mL e 100 µL do extrato diluído, sendo a reação iniciada pela adição de 200 µL de ditionito de sódio a 25 mg/mL, preparado em uma solução de NaHCO₃ a 290 mM. Os tubos contendo o meio de reação foram incubados a 30 °C, por 20 min, em banho-maria. Após esse período, 50 µL do meio de reação foram adicionados a tubos de ensaio contendo 950 µL de água desionizada, sendo a reação interrompida por agitação vigorosa dos tubos para oxidar o ditionito de sódio remanescente. Em seguida, determinou-se a concentração de nitrito no meio de reação, em procedimento idêntico ao descrito no item 3.14.1. A atividade da NiR foi expressa em µmol NO₂⁻ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.14.3 Sintetase da glutamina

Os extratos para a determinação da atividade da sintetase da glutamina (GS) foram preparados de acordo com o método descrito por Seebauer *et al.* (2004), com pequenas modificações. Amostras de 500 mg de folhas ou raízes congeladas foram pulverizadas em almofariz, utilizando nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas em tampão imidazol a 50 mM, pH 7,2, contendo MgSO₄ a 20 mM, EDTA a 1 mM, DTT a 5 mM, PVP a 1% (p/v) e β-mercaptoetanol a 1% (v/v). O homogeneizado foi filtrado em tecido de náilon, sendo, em seguida, centrifugado a 14.000 × g, durante 30 min, a 4 °C. O sobrenadante (extrato) resultante foi mantido em banho de gelo até a utilização nos ensaios enzimáticos, os quais foram feitos no mesmo dia da extração. Todo o procedimento foi realizado a 4 °C.

A atividade da GS foi determinada de acordo com o método descrito por Rhodes, Rendon e Stewart (1975), através da formação de γ-glutamil hidroxamato (reação “sintetase”) a partir do glutamato e hidroxilamina (em substituição ao amônio, o substrato fisiológico). O meio de reação (volume final de 1 mL) consistiu de tampão imidazol a 100 mM, pH 7,2, glutamato a 80 mM (neutralizado com imidazol), ATP a 10 mM, MgCl₂ a 50 mM e 100 μL do extrato, sendo a reação iniciada pela adição de 100 μL de hidroxilamina a 250 mM. Os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados a 35 °C, por 20 min, em banho-maria. Após esse período, a reação enzimática foi parada pela adição de 1 mL de uma solução contendo FeCl₃ a 0,37 M, HCl a 0,67 N e TCA a 0,2 M. Estabelecida a cor da reação (após aproximadamente 10 min), as amostras foram centrifugadas a 10.000 × g, por 10 min. A quantidade de γ-glutamil hidroxamato formada pela GS foi determinada colorimetricamente pela leitura de absorbância em 540 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de γ-glutamil monohidroxamato (GHM). A atividade da GS foi expressa em μmol GHM min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.14.4 Sintase do glutamato

Os extratos para esta análise foram os mesmos utilizados para a atividade da NiR, sendo os ensaios enzimáticos realizados no mesmo dia da extração. A atividade da enzima GOGAT foi determinada de acordo com o método de Nemat-Alla *et al.* (2008), através da quantificação do NADH oxidado. A mistura de reação foi composta de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,5, NADH a 0,15 mM, glutamina a 10 mM e α-cetoglutarato a 10 mM. A reação foi iniciada pela adição do extrato e acompanhada diretamente no

espectrofotômetro pela redução da absorvância a 340 nm. A atividade da GOGAT foi calculada pela taxa de oxidação do NADH, utilizando-se o seu coeficiente de extinção molar, ($\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo expressa em $\text{nmol Glu min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína, considerando-se a estequiometria da reação.

Os extratos utilizados para as determinações de atividade enzimática foram dosados quanto ao teor de proteína pelo método de Bradford (1976), para permitir a mensuração da atividade específica das enzimas. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 μL do extrato convenientemente diluído, seguido pela adição de 1,0 mL do reagente composto por azul de coomassie brilhante G-250 a 0,01% (m/v), etanol a 4,75% (v/v) e ácido fosfórico (H_3PO_4) a 8,5%. Após 15 min, a concentração de proteínas solúveis foi estimada pela leitura de absorvância em 595 nm, com base em uma curva padrão ajustada com concentrações crescentes de albumina sérica bovina.

3.15 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3×2 , formado por três fontes de N (apenas NO_3^- , mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ou apenas NH_4^+) e dois níveis de salinidade (NaCl a 0 ou 75 mM), com quatro repetições, sendo cada uma delas constituída por duas plantas. Os dados de cada coleta foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias resultantes, comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão das repetições de cada tratamento. O programa utilizado para as análises estatísticas e para a confecção dos gráficos foi o SigmaPlot [versão 11.0, (SYSTAT Software, Inc.)].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

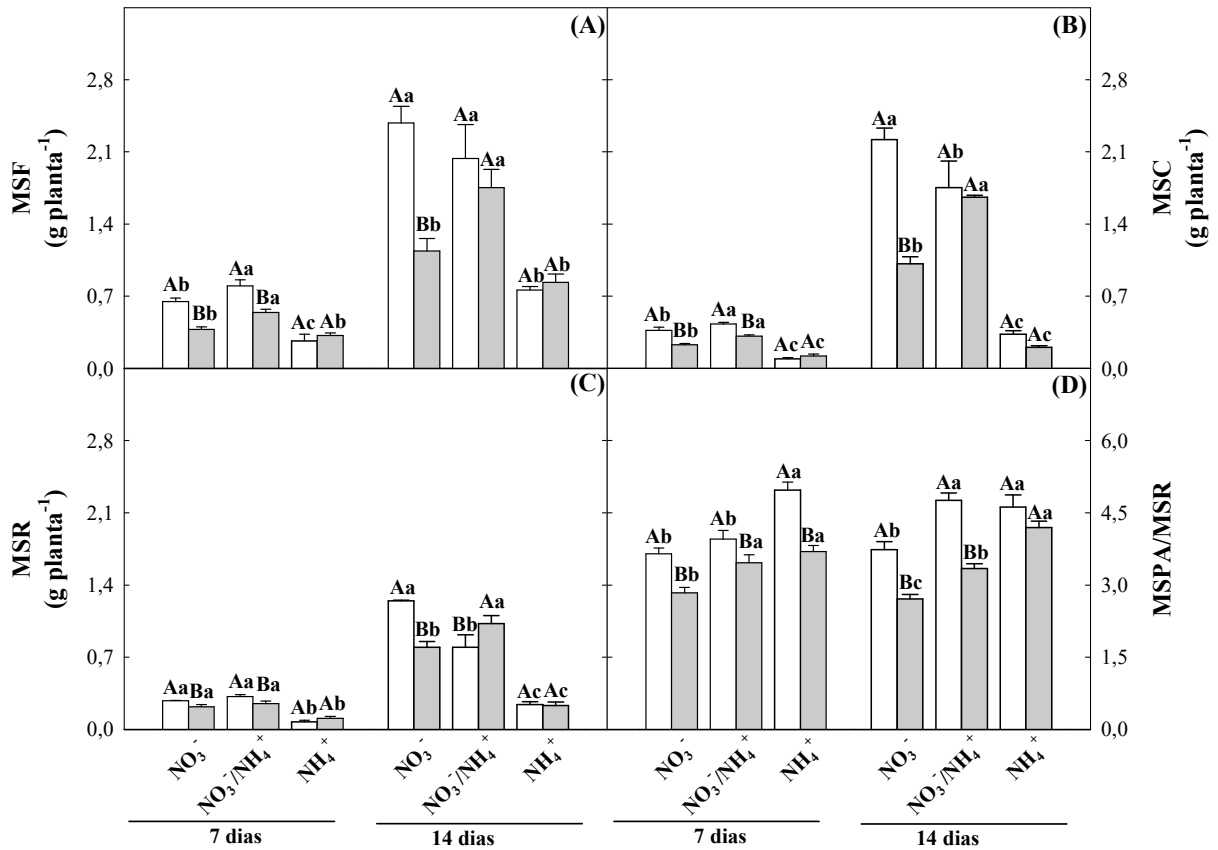
4.1 Crescimento vegetativo

Com o objetivo de verificar o efeito da fonte de nitrogênio (NO_3^- , $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ e NH_4^+) no crescimento de plantas de girassol sob condições de salinidade, foram determinadas a massa seca das folhas (MSF), do caule (MSC) e das raízes (MSR), a relação entre a massa seca da parte aérea e das raízes (MSPA/MSR) e a área foliar (AF).

De maneira geral, todas as variáveis de crescimento foram afetadas pela salinidade e pela fonte de N empregada, em ambos os tempos de coleta (Figuras 1 e 2). A MSF foi reduzida mais intensamente pela salinidade nas plantas que tiveram NO_3^- como única fonte de N (Figura 1A). Isso aconteceu tanto aos 7 dias sob estresse salino, quanto aos 14 dias, em que houve reduções de 41,6% e 52,1% nessa variável, respectivamente, em comparação aos respectivos controles. Além disso, plantas de girassol nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em condições de estresse salino, apresentaram maior MSF, quando comparadas às plantas dos demais tratamentos de N e salinidade, nos dois tempos de coleta analisados (Figura 1A). A salinidade não interferiu significativamente na MSF das plantas nutridas com NH_4^+ , contudo essas plantas foram as que apresentaram os menores valores de MSF, tanto em condições controle, quanto em condições de estresse (Figura 1A). A MSC apresentou resposta semelhante à da MSF, tanto em relação à salinidade, quanto em relação às fontes de N a que as plantas foram submetidas (Figura 1B). A MSR das plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foi reduzida em uma mesma proporção (redução média de 21%) aos 7 dias de estresse, enquanto que, aos 14 dias de estresse, a salinidade reduziu em 36% a MSR das plantas nutridas com NO_3^- , e aumentou essa variável em 28%, nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 1C). Como observado anteriormente para a parte aérea, a MSR das plantas nutridas com NH_4^+ não foi influenciada significativamente pela salinidade, e as raízes dessas plantas cresceram menos, em comparação às plantas das outras fontes de N, seja em condições controle, seja em condições de salinidade (Figura 1C).

A inibição do crescimento vegetal é uma resposta típica de glicófitas à salinidade (FEIJÃO *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2011). Neste trabalho, apenas as plantas de girassol nutridas com NH_4^+ não tiveram seu crescimento afetado pela salinidade (Figuras 1 e 2). Outros autores também observaram reduções no crescimento de plantas de girassol submetidas ao estresse salino (ASHRAF, 1999; CAMPOS *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012; NOBRE *et al.*, 2011).

Figura 1. Massa seca das folhas (MSF; A), do caule (MSC; B) e das raízes (MSR; C) e relação entre a massa seca da parte aérea e das raízes (MSPA/MSR; D) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

O crescimento de muitas espécies vegetais é claramente afetado pela forma de N a que elas são submetidas. Além disso, trabalhos anteriores mostraram que diferentes fontes de N podem influenciar a tolerância das plantas à salinidade (DLUZNIEWSKA *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2007; MIRANDA *et al.*, 2013). Os resultados deste trabalho mostraram que, em condições de estresse, plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apresentaram maior crescimento da parte aérea, em ambos os tempos de coleta, e da raiz, aos 14 dias, em comparação aos demais tratamentos de N (Figura 1A, 1B, 1C). O provimento de uma fonte combinada de N ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) também melhorou a tolerância de outras espécies aos sais (FLORES *et al.*, 2001; KANT *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2011).

Além disso, foi observado neste trabalho que a MSF e MSC, em ambos os tempos de coleta, e a MSR, aos 14 dias, foram reduzidas pela salinidade de forma mais pronunciada nas plantas tratadas com NO_3^- do que nas dos demais tratamentos de N (Figura 1A, 1B e 1C). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (KANT *et al.*, 2007; TANG *et*

al., 2011). A inibição do transporte de NO_3^- das raízes até a parte aérea é uma das causas possíveis da redução do crescimento de plantas nutridas com NO_3^- e submetidas à salinidade (ARAGÃO *et al.*, 2012; FEIJÃO *et al.*, 2013). Por outro lado, alguns estudos mostraram que o crescimento foi favorecido quando plantas submetidas ao estresse salino foram nutridas com apenas NO_3^- (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005; SHAABAN; EL-NOUR, 2013).

Neste trabalho foi observada uma menor produção de biomassa em plantas nutridas com NH_4^+ , cujo crescimento não foi influenciado significativamente pela salinidade. Isso indica uma resposta das plantas ao efeito de toxidez causado pelo NH_4^+ , que, aparentemente, preponderou sobre o do estresse salino, sendo provavelmente o fator que mais limitou o crescimento (Figura 1). Respostas semelhantes foram encontradas em plantas de trigo, pinheiro e arroz (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; GRIFFIN; WINNER; STRAIN, 1995; HOLZSCHUH *et al.*, 2011). Em oposição ao encontrado neste estudo, plantas de *Citrus* e da halófito *S. alterniflora* não somente cresceram mais, tendo NH_4^+ como única fonte de N, como também foram mais tolerantes ao estresse salino (FERNÁNDEZ-CRESPO; CAMAÑES, AUGUSTÍN, 2012; HESSINI *et al.*, 2013).

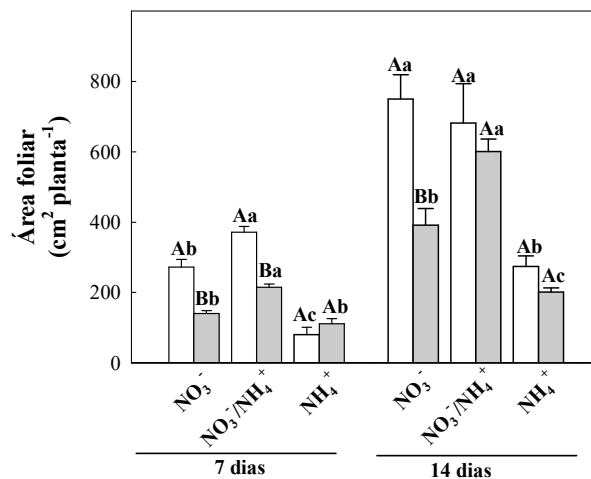
De maneira geral, a relação MSPA/MSR foi reduzida pela salinidade durante todo o período experimental e em todos os tratamentos de N (Figura 1D). As maiores reduções nessa variável foram observadas nas plantas nutridas com NH_4^+ (25%), aos 7 dias, e naquelas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (30%), aos 14 dias de estresse, em comparação aos respectivos controles (Figura 1D). A maior redução, pela salinidade, da relação MSPA/MSR observada em plantas submetidas à mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ evidencia uma característica de tolerância à salinidade, já que a menor redução do crescimento das raízes pode ser atribuída a uma resposta que amplia a área de absorção de nutrientes e água, de forma a minimizar os efeitos prejudiciais dos sais (FERREIRA; TÁVORA; FERREYRA, 2001). Na Figura 1D, nota-se que houve um aumento na relação MSPA/MSR à medida que a proporção de NO_3^- na solução nutritiva diminuiu, tanto em condições controle, quanto de salinidade. De acordo com Forde (2002), o NO_3^- atua como um sinal, estimulando o desenvolvimento de raízes e determinando a translocação de esqueletos carbônicos oriundos da fotossíntese para esse órgão. Assim, é possível que a menor proporção desse nutriente na solução nutritiva tenha contribuído para o menor crescimento das raízes e conseqüentemente maior relação MSPA/MSR.

Pôde-se observar neste estudo que, independentemente da fonte de N, a salinidade afetou mais o crescimento da parte aérea do que o das raízes (Figura 1). A redução da relação MSPA/MSR frente à salinidade já foi observada em várias glicófitas (AZEVEDO NETO *et*

al., 2004; DEBOUBA *et al.*, 2006b; LACERDA *et al.*, 2001), inclusive em plantas de girassol (ASHRAF, 1999; SILVA, 2013). De acordo com Munns (2002), apesar das raízes serem os órgãos da planta que estão diretamente expostos ao estresse, elas são menos vulneráveis aos sais do que a parte aérea, devido principalmente a um ajustamento osmótico mais rápido e a uma perda de turgor mais lenta das raízes, em comparação à parte aérea. Desse modo, o crescimento radicular pode ser menos sensível aos sais que o crescimento da parte aérea.

A salinidade reduziu a AF das plantas de girassol, e essa redução foi mais conspícua nas plantas nutridas com NO_3^- , nas quais houve reduções médias de 48% na AF, em comparação aos respectivos controles, aos 7 e 14 dias de estresse (Figura 2).

Figura 2. Área foliar (AF) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando-se os tratamentos de N, plantas que foram nutridas apenas com NH_4^+ , apresentaram menor AF, tanto em condições controle, como de salinidade, em ambos os tempos experimentais (Figura 2). Esses resultados foram concordantes com aqueles observados na MSF, nos quais plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apresentaram melhor crescimento em condições de estresse salino, em ambos os tempos de coleta analisados (Figura 1A). O declínio da AF pela salinidade é uma das respostas iniciais de glicófitas ao estresse, podendo ocorrer devido à inibição da divisão e expansão das células nas regiões meristemáticas (MUNNS; TERMAAT, 1986; PARIDA; DAS, 2005).

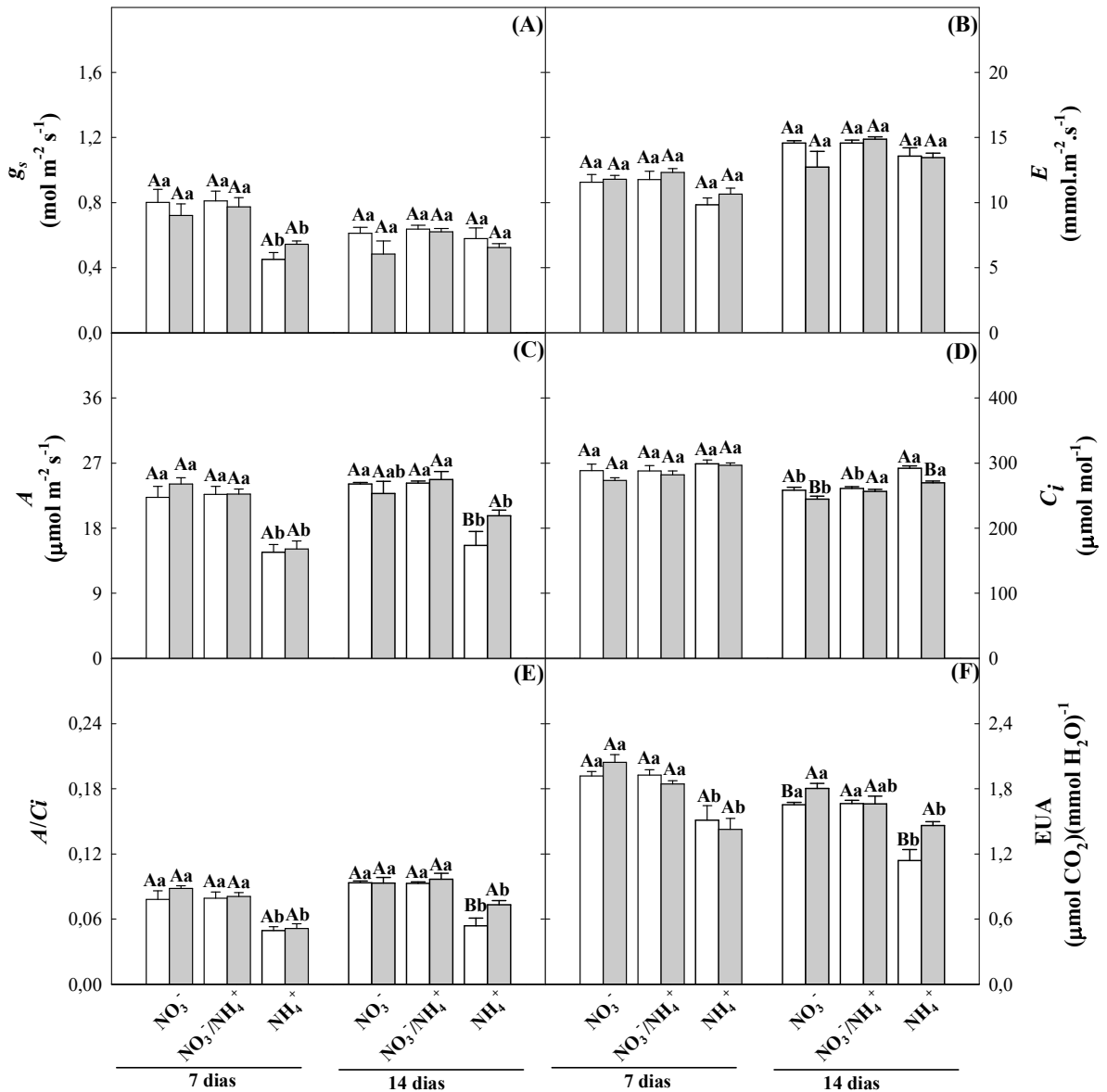
4.2 Trocas gasosas e eficiência no uso da água

Para verificar se as diferenças no crescimento entre os três tratamentos de N estavam relacionadas com a assimilação do carbono, foram determinadas as trocas gasosas das plantas de girassol. Como se pode observar na Figura 3, essas variáveis, de maneira geral, foram afetados apenas pela fonte de N empregada, sendo observadas pequenas alterações com a salinidade. A g_s e a E das plantas de girassol não foram alteradas pelo estresse salino (Figura 3A e 3B), contudo plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram uma menor g_s , aos 7 dias, quando comparadas com as dos demais tratamentos de N (Figura 3A). A nutrição com NH_4^+ reduziu a A das plantas, e, aos 14 dias de estresse, houve um aumento da A nas plantas tratadas com este íon (Figura 3C). Neste mesmo tempo, a salinidade provocou pequenas reduções (6,5%, em média) na C_i nas plantas nutridas apenas com NO_3^- ou NH_4^+ (Figura 3D).

As medidas de trocas gasosas, de maneira geral, não se correlacionaram às respostas de crescimento do girassol em condições de estresse, nos diferentes tratamentos de N, já que não se observaram efeitos da salinidade nessas variáveis (Figuras 1 e 3). Apesar disso, plantas de girassol nutridas com NH_4^+ apresentaram uma menor g_s aos 7 dias de estresse e uma menor A durante todo o período experimental, sendo isso provavelmente devido aos efeitos deletérios do NH_4^+ em excesso nas plantas. Um desses efeitos adversos é a diminuição da abertura estomática e a subsequente redução na taxa fotossintética (FOYER; NOCTOR, 2003; GUO; ZU; TANG, 2012).

A inibição do crescimento observada nas plantas nutridas com NH_4^+ pode estar associada à menor taxa de assimilação de carbono. Vários trabalhos têm demonstrado uma maior redução da fotossíntese em plantas que tiveram o NH_4^+ como única fonte de N, tanto em condições controle como de estresse salino (ASHRAF, 1999; FRECHILLA *et al.*, 2001; GUO; ZU; TANG, 2012), e, neste trabalho, o efeito do NH_4^+ foi mais severo que a salinidade para as trocas gasosas. O íon NH_4^+ em excesso afeta a fotofosforilação, desacoplando-a, inibindo, assim, a síntese do ATP, porém com manutenção do fluxo de elétrons (ASHRAF, 1999). Neste trabalho, plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apresentaram maiores valores de A , que resultaram em uma maior assimilação de carbono, explicando, pelo menos em parte, o maior acúmulo de biomassa nessas plantas, em comparação às nutridas com apenas NH_4^+ .

Figura 3. Condutância estomática (g_s ; A), transpiração (E ; B), fotossíntese líquida (A ; C), concentração interna de CO_2 (C_i ; D), eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i ; E) e eficiência do uso da água (EUA; F) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

De maneira semelhante ao observado para a A , a eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) e a EUA foram menores em plantas nutridas com NH_4^+ , quando comparadas às plantas dos demais tratamentos de N (Figura 3E e 3F). Com relação à salinidade, aos 14 dias, houve aumentos de 35%, na A/C_i , e de 29%, na EUA, em plantas de girassol nutridas com NH_4^+ (Figura 3E e 3F). Portanto, plantas nutridas com NH_4^+ foram menos eficientes na fixação de CO_2 , em comparação àquelas das demais fontes de N, pois elas apresentaram menor A , mesmo com elevada C_i , a qual não variou significativamente entre as

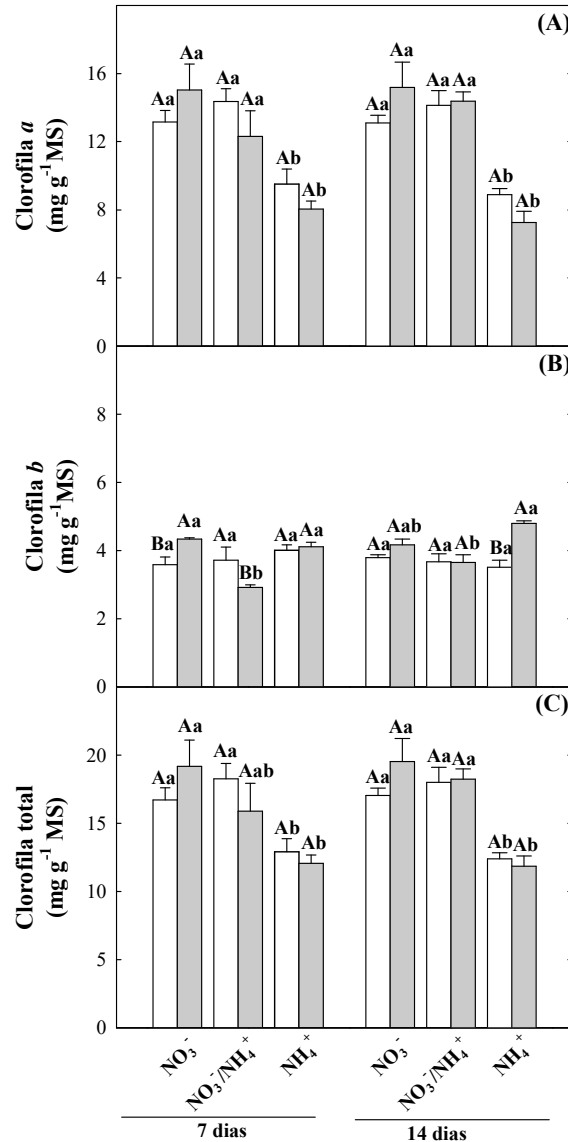
fontes de N, evidenciando, portanto, a existência de danos no aparato fotossintético dessas plantas, devido provavelmente aos efeitos tóxicos do NH_4^+ . Essas plantas também foram as menos eficientes no uso da água (Figura 3F). Em plantas de milho, foram observadas reduções na EUA com a salinidade, sendo esse efeito mais conspícuo em plantas nutridas com NH_4^+ . Em discordância com os resultados deste trabalho, Ashraf (1999), trabalhando também com girassol, observou maior EUA em plantas nutridas com NH_4^+ sob condições de salinidade, em comparação com as nutridas com NO_3^- .

4.3 Teores de clorofila

Os teores de clorofila *a* não foram alterados significativamente pela salinidade, porém plantas que tiveram o NH_4^+ como única fonte de N apresentaram menores teores deste pigmento, quando comparadas às das demais fontes de N (Figura 4A). Com relação aos teores de clorofila *b*, foram observadas respostas diferenciais à salinidade, que dependeram da fonte de N empregada (Figura 4B). Aos 7 dias de estresse, a salinidade aumentou em 21% os teores de clorofila *b* de plantas nutridas com NO_3^- ; reduziu em 22% esses teores naquelas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$; e não alterou os teores desse pigmento nas plantas nutridas apenas com NH_4^+ . Já aos 14 dias, a salinidade afetou os teores de clorofila *b* apenas nas plantas nutridas com NH_4^+ , em que se observaram aumentos de 37%, em relação ao controle (Figura 4B). Os teores totais de clorofila responderam de maneira semelhante aos de clorofila *a*, tanto em relação à salinidade, quanto em relação às fontes de N a que as plantas foram submetidas (Figura 4C).

Os menores teores de clorofila observados nas plantas nutridas com NH_4^+ podem justificar, pelo menos em parte, as menores taxas fotossintéticas verificadas nessas plantas. Em concordância com este trabalho, algumas pesquisas anteriores mostraram que a concentração de clorofila foi maior sob nutrição combinada de N (YU *et al.*, 2011) ou unicamente com NO_3^- (ALI *et al.*, 2013; XIN *et al.*, 2011). Entretanto, muitos trabalhos não encontraram diferenças significativas no conteúdo de clorofila em resposta a fontes diferentes de N (ASHRAF, 1999; GUO; ZU; TANG, 2012). De modo geral, o conteúdo de clorofila é reduzido quando as plantas são submetidas a estresse salino (DEBOUBA *et al.*, 2006a; M'RAH *et al.*, 2006; PANDA; UPADHYAY; UPADHYAYA, 2006), mas também pode ocorrer aumento nos teores desse pigmento, dependendo do nível de sal ao qual a planta é exposta (MA *et al.*, 1997).

Figura 4. Teores de clorofila *a* (A), *b* (B) e total (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



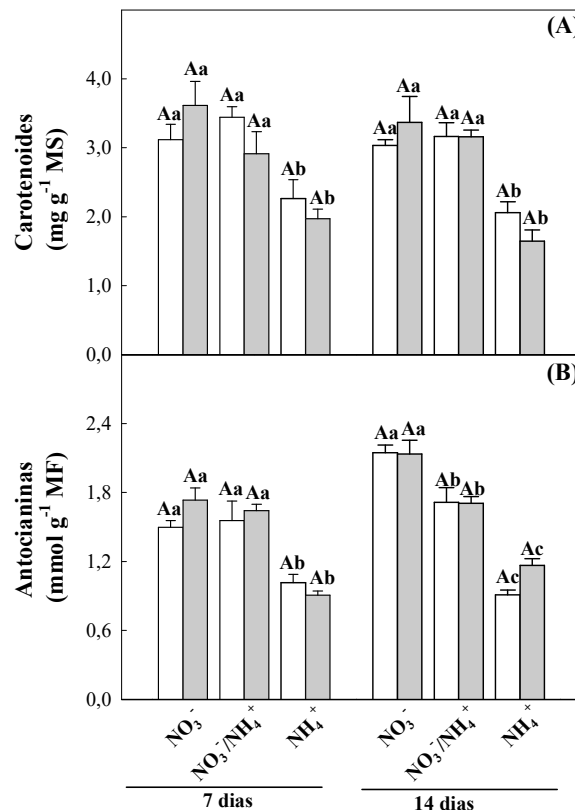
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Teores de carotenoides e antocianinas

A Figura 5 apresenta os teores de carotenoides e de antocianinas. Os teores de ambos os pigmentos não foram afetados pela salinidade, contudo eles reduziram significativamente quando as plantas de girassol foram nutridas unicamente com NH_4^+ (Figura 5A e 5B). Houve reduções médias de 35%, aos 7 dias, e de 42%, aos 14 dias, nos teores de carotenoides das plantas nutridas unicamente com NH_4^+ , em comparação com os demais tratamentos de N (Figura 5A). Em concordância com esses resultados, plantas de

cevada nutridas com NH_4^+ apresentaram os menores conteúdos de carotenoides em relação à outras fontes de N (ureia e NO_3^-) (ALI *et al.*, 2013).

Figura 5. Teores de carotenoides (A) e de antocianinas (B) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Aos 7 dias de estresse, os teores de antocianinas nas plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ não diferiram estatisticamente entre si, mas reduziram 40%, em média, nas plantas nutridas com NH_4^+ , em relação aos outros tratamentos de N (Figura 5B). Aos 14 dias, as plantas nutridas com NO_3^- apresentaram os maiores teores de antocianinas, os quais foram reduzidos em 20% e 51% nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ e NH_4^+ , respectivamente (Figura 5B). Ao contrário do que se observou em plantas de girassol, a nutrição amoniacal elevou os teores de antocianinas em outras espécies (KARRAY-BOURAOUI *et al.*, 2010; NIU *et al.*, 2012).

Os carotenoides desempenham um importante papel no complexo coletor de luz e na proteção contra fotodanos ao aparato fotossintético (ORT, 2001; YOUNG; PHILLIP; SAVILL, 1997). Esses compostos são antioxidantes com potencial para desintoxicar as plantas contra os efeitos das EROs (SAI KACHOUT *et al.*, 2013). Os menores teores de

carotenóides encontrados nas plantas nutridas com NH_4^+ provavelmente as deixaram mais expostas a danos em seu aparato fotossintético, contribuindo assim, para a redução da *A* nessas plantas, em comparação aos demais tratamentos de N. Neste trabalho, os teores de carotenoides não foram influenciados pela salinidade, porém há relatos de que a salinidade induziu o acúmulo desses compostos, na tentativa de proteger a célula contra este estresse (SAI KACHOUT *et al.*, 2013).

Antocianinas são metabólitos secundários que desempenham diversas funções nas plantas, tais como proteção contra luz ultravioleta, atração de insetos polinizadores, precursor da lignina (BEGGS *et al.*, 1987; DIXON; PAIVA, 1995). Além disso, esses compostos desempenham um papel importante nas respostas das plantas ao estresse, por serem moléculas antioxidantes que protegem as plantas contra os danos causados pelas EROs (NAGATA *et al.*, 2003) e por seu papel osmoprotetor em condições de estresse hídrico e salino (DARCANSOY İŞERI *et al.*, 2013). De modo geral, a síntese de antocianinas é induzida sob salinidade (ERYLMAZ, 2006), contudo isso não foi observado nas plantas de girassol (Figura 5B). Plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram menores teores desse pigmento em comparação às demais fontes de N. Assim, um dos fatores que inibiram o crescimento dessas plantas pode ser atribuído a uma redução em seu poder antioxidante.

4.5 Vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios

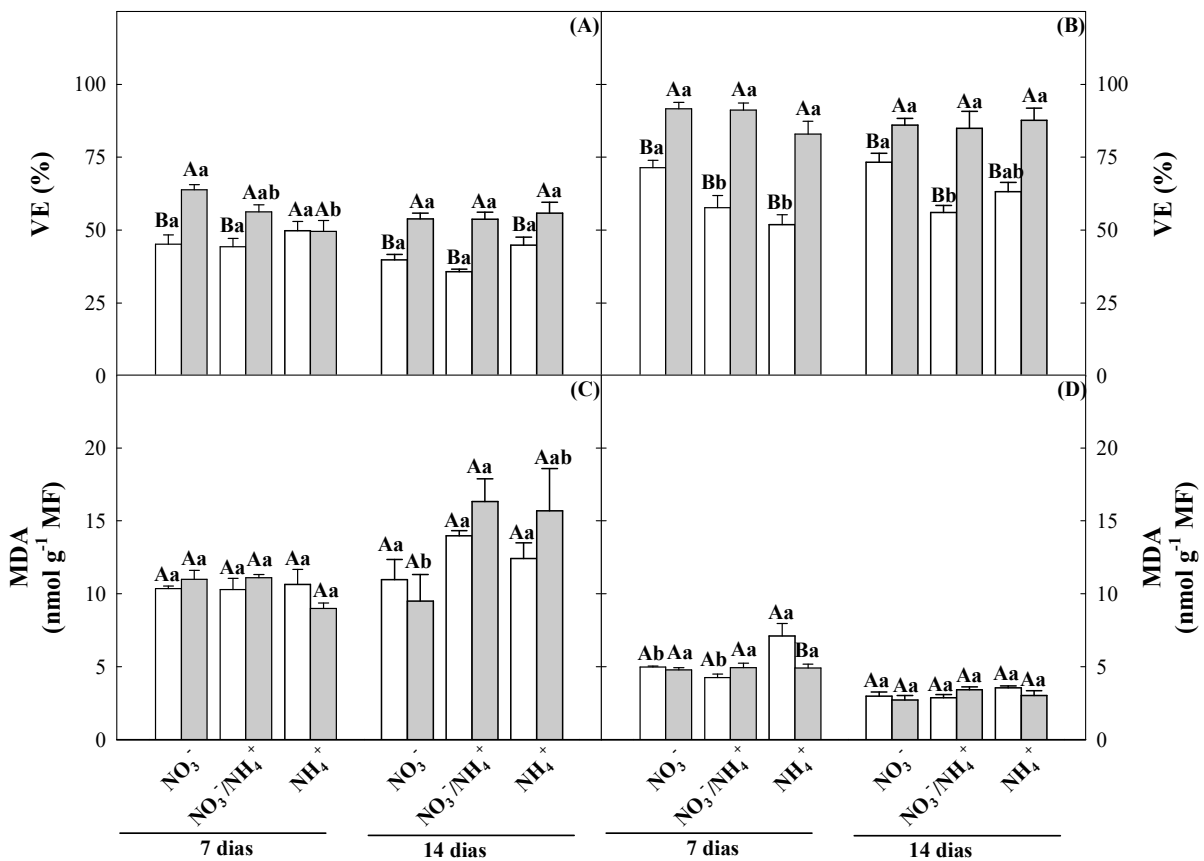
Os danos oxidativos resultantes da salinidade e dos tratamentos de N foram mensurados através da determinação do VE e da peroxidação dos lipídeos de membrana (Figura 6). Nas folhas de plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, houve aumentos no VE em decorrência da exposição das plantas à salinidade por 7 ou 14 dias (Figura 6A); nas raízes, contudo, o VE foi aumentado pelo estresse salino em todos os tratamentos de N, sendo os maiores aumentos observados nas plantas tratadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 6B).

Em condições de estresse salino, há um aumento na produção de EROs, que podem ocasionar danos às membranas celulares (CARVALHO *et al.*, 2011). Além disso, o excesso de sais, principalmente o Na^+ , causa deficiência dos íons K^+ e Ca^{2+} nas plantas, que afeta a permeabilidade e a estabilidade da membrana plasmática (CRAMER; LÄUCHLI; POLITO, 1985). Como esperado, houve elevações no percentual de VE nas plantas de girassol expostas a NaCl (Figuras 6A e 6B). O aumento da permeabilidade da membrana, causado pela salinidade, já foi reportado anteriormente por outros autores (CARVALHO *et*

al., 2011; DKHIL; DENDEN, 2012), e essa variável não foi dependente da fonte de N empregada neste estudo.

A peroxidação dos lipídios foi inferida através da quantificação dos teores de malondialdeído (MDA) em folhas e raízes de plantas de girassol (Figura 6C e 6D). Tanto a salinidade quanto as diferentes fontes de N influenciaram pouco esse parâmetro. Nas folhas, aos 14 dias, os menores teores de MDA sob condições salinas, foram observados em plantas nutridas com NO_3^- , quando comparadas com as dos demais tratamentos de N (Figura 6A). Nas raízes, a salinidade reduziu os teores de MDA em 31% nas plantas nutridas com NH_4^+ , aos 7 dias de estresse (Figura 6D).

Figura 6. Vazamento de eletrólitos (VE) e teores de malondialdeído (MDA) em folhas (A e C) e raízes (B e D) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

O estresse oxidativo induzido pela salinidade também pode causar intensa peroxidação lipídica (HERNANDEZ; ALMANSA, 2002); entretanto, a intensidade dos danos oxidativos pode variar e depende de quão rápida é a proteção antioxidativa (MUNNS; TESTER, 2008). Neste estudo, o nível de peroxidação de lipídeos, demonstrado pelos teores

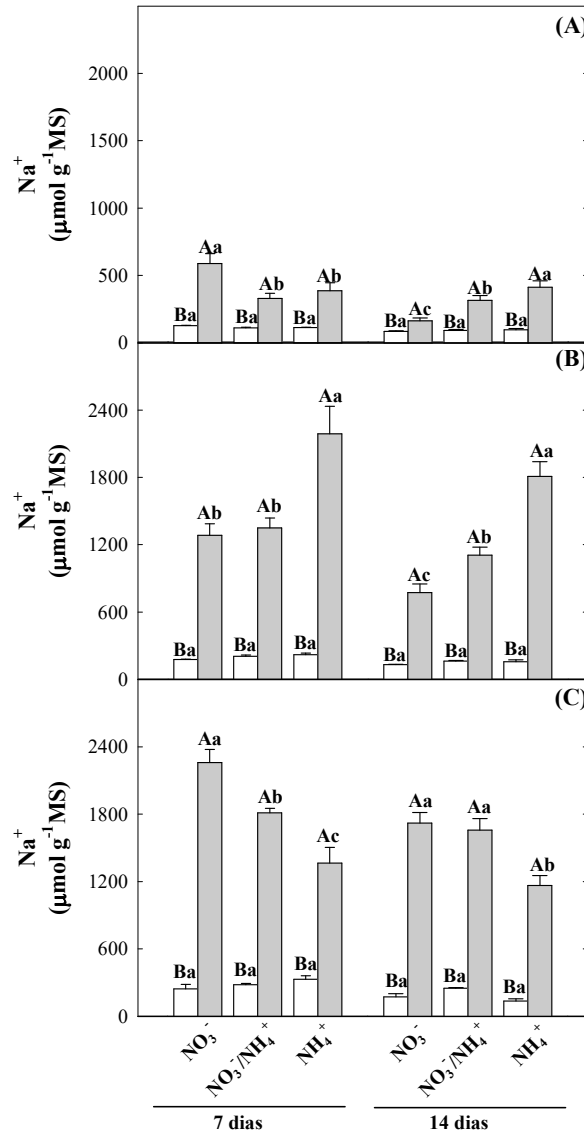
de MDA, foi pouco afetado pela salinidade e não dependeu das fontes de N empregadas. Ademais, plantas nutridas com NH_4^+ foram as que apresentaram as menores concentrações de compostos antioxidantes (carotenoides e antocianinas) entre as fontes de N estudadas, mas isso não refletiu em aumento dos danos de membrana nessas plantas.

4.6 Teores de íons

Os teores de Na^+ nas plantas foram influenciados pelo estresse salino e pelas diferentes fontes de N. Como esperado, o íon Na^+ aumentou bastante com o estresse salino nos diferentes tratamentos de N e órgãos das plantas de girassol (Figura 7A, 7B e 7C). Nas folhas, aos 7 dias de estresse, os maiores aumentos nos teores de Na^+ , decorrentes da salinidade, foram observados nas plantas nutridas com NO_3^- , nas quais eles aumentaram aproximadamente 4 vezes, em comparação ao respectivo controle. Aos 14 dias, plantas nutridas com NH_4^+ foram as que tiveram os teores de Na^+ mais aumentados pelo estresse salino (cerca de três vezes), e entre as plantas estressadas, aquelas nutridas com NO_3^- foram as que menos acumularam esse íon tóxico (Figura 7A). Nos caules, plantas nutridas que tiveram NH_4^+ como única fonte de N apresentaram os maiores aumentos nos teores de Na^+ , em ambos os tempos de estresse (Figura 7B). Nas raízes, de maneira contrária aos caules, plantas nutridas com NH_4^+ foram as que menos acumularam Na^+ , em condições de salinidade, e os maiores acúmulos desse íon foram observados nas plantas nutridas com NO_3^- , aos 7 dias de estresse, e tanto nas plantas nutridas com NO_3^- , quanto naquelas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, aos 14 dias de estresse (Figura 7C). Pôde-se observar, portanto, que as plantas cultivadas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ acumularam mais Na^+ em suas raízes, enquanto que nas plantas nutridas com NH_4^+ , o maior acúmulo desse íon foi observado nos caules (Figura 7). Esse fato demonstra a capacidade dessa espécie em controlar o transporte de Na^+ para os tecidos foliares. Um maior conteúdo de Na^+ nas raízes de plantas de girassol submetidas à salinidade também tem sido observado por outros autores (ASHRAF; SULTAMA, 2000).

Como esperado, as plantas sob estresse apresentaram uma maior eficiência de absorção de Na^+ (EA_{Na}) (Tabela 2). Com relação às fontes de N, houve uma menor EA_{Na} nas plantas nutridas com NO_3^- , aos 7 dias, em condições controle, e aos 14 dias, em condições de salinidade. A eficiência de transporte de Na^+ (ET_{Na}) foi afetada pela salinidade apenas aos 14 dias de estresse, nas plantas nutridas com NO_3^- , nas quais houve uma redução de 57%, em comparação ao seu respectivo controle (Tabela 2).

Figura 7. Teores de Na^+ em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2. Eficiências de absorção (EA_{Na}) e de transporte (ET_{Na}) de Na^+ em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (NaCl a 0 mM) ou de estresse salino (NaCl a 75 mM) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$).

NaCl (mM)	EA_{Na} ($\mu\text{mol Na}^+ \text{mg}^{-1}$ massa seca de raiz)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	0,754 Bb	0,852 Ba	1,003 Ba	0,570 Ba	0,792 Ba	0,621 Ba
75	4,355 Aa	4,261 Aa	3,750 Aa	3,159 Ab	3,685 Aa	4,235 Aa
NaCl (mM)	ET_{Na} ($\mu\text{mol Na}^+ \text{parte aérea} \mu\text{mol}^{-1} \text{Na}^+ \text{planta}$)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	0,548 Aa	0,516 Aa	0,422 Aa	0,590 Aa	0,513 Aa	0,661 Aa
75	0,381 Aa	0,391 Aa	0,435 Aa	0,255 Bb	0,527 Aa	0,639 Aa

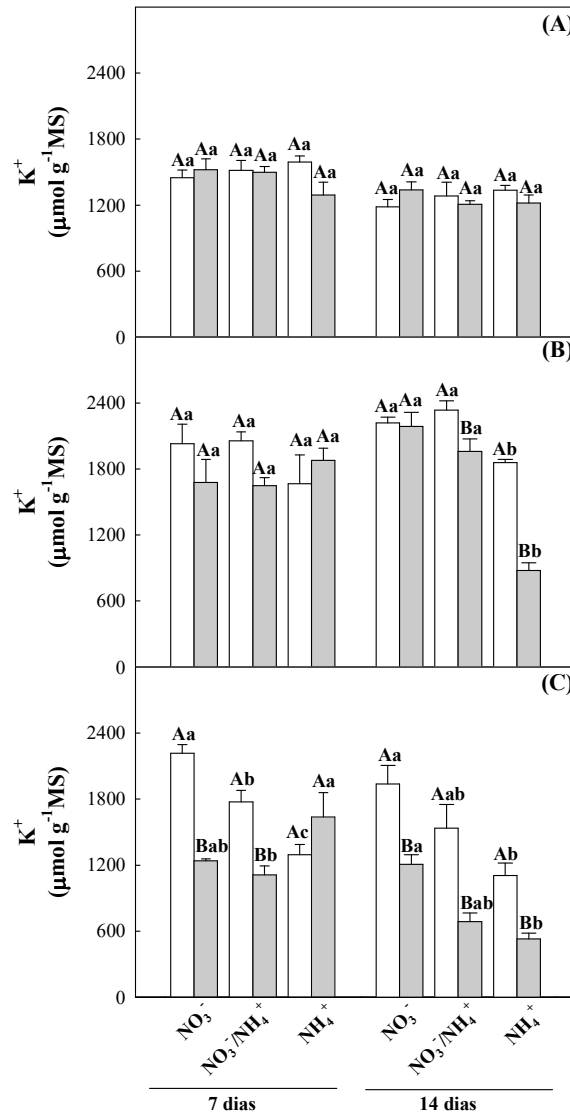
Fonte: Elaborada pela autora.

Neste estudo foi observado que plantas nutridas com NO_3^- foram as que menos absorveram Na^+ em condições de salinidade, aos 14 dias (Tabela 2). Isso indica que apesar da competição entre a absorção dos íons NH_4^+ e Na^+ ser bem reportada em várias espécies (KANT *et al.*, 2007; MIRANDA *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2011), em plantas de girassol, isso aparentemente não ocorreu, já que a nutrição com NH_4^+ não reduziu a absorção de Na^+ . Plantas nutridas com NH_4^+ foram as que menos acumularam Na^+ nas raízes, em condições de salinidade, comparando-se com os demais tratamentos de N, porém foram também as que mais acumularam esse íon nos caules (Figura 7B e 7C), indicando que a absorção de Na^+ foi pouco influenciada pelas diferentes fontes de N, e que apenas a distribuição desse íon nas diversas partes da planta é que foi dependente do tratamento de N (Figura 7).

Nas folhas, os teores de K^+ mantiveram-se inalterados em condições de estresse salino e não foram influenciados pelas fontes de N empregadas (Figura 8A). Nos caules, a salinidade reduziu os teores de K^+ apenas quando a duração do estresse aumentou (14 dias), em que foram observadas reduções de 16%, nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, e de 53%, naquelas nutridas com apenas NH_4^+ , em comparação a seus respectivos controles (Figura 8B). Nas raízes, aos 7 dias de estresse, as plantas nutridas com NO_3^- foram as que apresentaram as maiores reduções nos teores de K^+ com a salinidade (44%), enquanto que as plantas nutridas com NH_4^+ não tiveram esses teores alterados pela salinidade (Figura 8C). Já aos 14 dias, a salinidade reduziu severamente os teores de K^+ em todos os tratamentos de N, e as maiores reduções nessa variável foram observadas nas plantas tratadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (55%), seguidas daquelas nutridas somente com NH_4^+ (52%) (Figura 8C). Além disso, vale ressaltar que as plantas nutridas com NH_4^+ foram as que menos acumularam K^+ nas raízes, em comparação às demais fontes de N (Figura 8C).

Em ambos os tempos de coleta, a eficiência de absorção de K^+ (EA_K) foi reduzida significativamente nas plantas sob estresse salino, em comparação àquela das plantas controle (Tabela 3). A EA_K foi influenciada pelas fontes de N apenas aos 7 dias de estresse, nos quais plantas nutridas com NH_4^+ foram as mais eficientes em absorver K^+ em condições de salinidade (Tabela 3). De maneira geral, em ambos os tempos analisados, a eficiência de transporte de K^+ (ET_K) foi maior nas plantas sob estresse salino e em todas as fontes de N empregadas (Tabela 3). Os maiores aumentos na ET_K , em razão da salinidade, foram observados, aos 7 dias, nas plantas nutridas com NO_3^- (73%), e, aos 14 dias de estresse, naquelas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (73%) (Tabela 3). Sob condições salinas, as plantas que apresentaram a maior ET_K durante todo o período experimental foram aquelas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Tabela 3).

Figura 8. Teores de K^+ em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3. Eficiências de absorção (EA_K) e de transporte (ET_K) de K^+ em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (NaCl a 0 mM) ou de estresse salino (NaCl a 75 mM) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$).

NaCl (mM)	EA_K ($\mu\text{mol K}^+ \text{mg}^{-1}$ massa seca de raiz)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	8,157 Aa	8,515 Aa	9,589 Aa	8,250 Aa	9,412 Aa	8,086 Aa
75	5,733 Bb	6,510 Bab	8,017 Ba	5,845 Ba	6,258 Ba	4,938 Bb

NaCl (mM)	ET_K ($\mu\text{mol K}^+ \text{parte aérea} \mu\text{mol}^{-1} \text{K}^+ \text{planta}$)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	0,737 Bb	0,968 Bab	1,250 Aa	0,889 Bb	1,214 Ba	1,421 Ba
75	1,279 Aab	1,432 Aa	0,993 Ab	1,457 Ab	2,098 Aa	2,046 Aa

Fonte: Elaborada pela autora.

Os teores foliares de K^+ foram inalterados, mesmo em condições de estresse salino, e não foram influenciados pelas fontes de N, como visto na Figura 8A. O K^+ é essencial para a expansão celular e para a homeostase da planta inteira (SCHACHTMAN *et al.*, 1997). A manutenção dos teores desse nutriente tem sido sugerida como um mecanismo comum de proteção contra os efeitos tóxicos dos sais, podendo até mesmo ser considerada um critério de distinção entre materiais sensíveis e tolerantes (AQUINO *et al.*, 2007; PARIDA; DAS, 2005). Nos caules e nas raízes das plantas de girassol, houve reduções nos teores de K^+ com a salinidade (Figura 8B e 8C). O comprometimento do estado nutricional das plantas, em termos de K^+ , em decorrência do aumento da absorção de Na^+ , é um fenômeno bastante conhecido (ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009; AZEVEDO NETO *et al.*, 2004; FEIJÃO *et al.*, 2013). As maiores reduções nos teores de K^+ nas raízes (Figura 8C) possivelmente se deveram à exposição direta desse órgão aos sais, o que provoca alterações na integridade e na permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao K^+ (GRATTAN; GRIEVE, 1999). Além disso, existe uma competição entre o Na^+ e o K^+ pela mesma proteína transportadora na membrana plasmática (NIU *et al.*, 1995).

Com relação às fontes de N empregadas, aos 14 dias de estresse, houve uma menor EA_K nas plantas nutridas com NH_4^+ (Tabela 3) e, além disso, houve menor acúmulo de K^+ nas raízes dessas plantas, seguidas das nutridas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ (Figura 8C). Nas plantas sob salinidade e nutridas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ ou somente com NH_4^+ , outro agente competidor pelos sítios de absorção de K^+ , afora o Na^+ , é adicionado: o íon NH_4^+ . Alguns trabalhos demonstram que o efeito combinado da salinidade e do amônio prejudica a absorção de outros cátions, tais como K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , levando a um desbalanço nutricional das plantas (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; ASHRAF; SULTANA, 2000). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com os observados em ervilha, trigo e azevém, em que a concentração de K^+ também foi reduzida quando as plantas foram nutridas com NH_4^+ e submetidas à salinidade (FRECHILLA *et al.*, 2001; IRSHAD *et al.*, 2002; KANT *et al.*, 2007).

A toxicidade encontrada em algumas plantas nutridas com NH_4^+ pode estar indiretamente relacionada a uma deficiência de K^+ , que surge a partir da competição entre os íons K^+ e NH_4^+ pelos mesmos sítios de absorção na membrana plasmática das raízes (SHAVIV *et al.*, 1990). É importante destacar que, apesar de ter havido uma menor EA_K em condições de salinidade, as plantas de girassol foram altamente eficientes em transportar esse elemento benéfico para a parte aérea, e isso contribuiu para a manutenção dos teores de K^+ nas folhas em condições de salinidade (Tabela 3). É provável ainda que os teores elevados de

K^+ nas folhas das plantas sob estresse sejam responsáveis, pelo menos em parte, pela inalterabilidade das trocas gasosas nessas condições (Figuras 3 e 8).

A relação Na^+/K^+ nos diversos órgãos das plantas de girassol aumentou significativamente quando as plantas foram submetidas à salinidade (Figura 9). Nas folhas, os maiores aumentos nessa relação, causados pelo estresse salino, foram verificados nas plantas nutridas com NO_3^- , aos 7 dias, e nas plantas nutridas com NH_4^+ , aos 14 dias, tendo aumentado cerca de 5 e 6 vezes, respectivamente, em comparação aos seus controles (Figura 9A). Nos caules, as plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram os maiores incrementos na relação Na^+/K^+ com o estresse salino, quando comparadas com os demais tratamentos de N, em quaisquer tempos de coleta (Figura 9B).

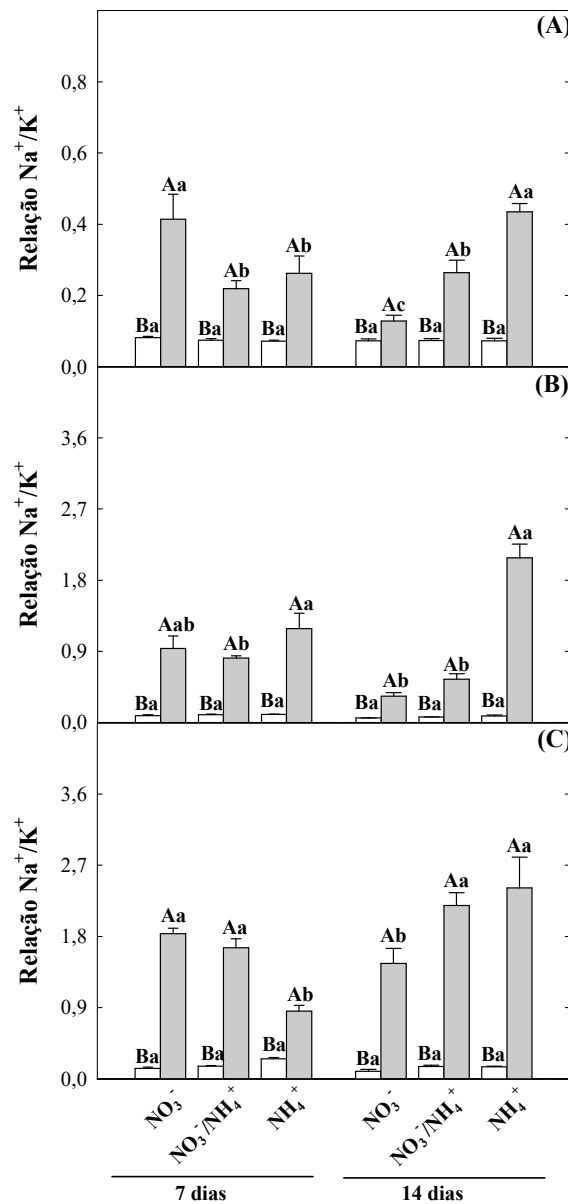
Nas raízes, aos 7 dias, os aumentos mais pronunciados nesta relação foram verificados nas plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura NO_3^-/NH_4^+ , sendo esses aumentos de 12 vezes, em média, em relação aos respectivos controles (Figura 9C). Quando as plantas foram submetidas à salinidade por 14 dias, os maiores incrementos na relação Na^+/K^+ com o estresse foram observados nas plantas tratadas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ e com NH_4^+ (15 vezes, em média). Levando-se em consideração os valores absolutos, a relação Na^+/K^+ foi maior nas raízes que nas outras partes da planta, especialmente no final do experimento, e isso se deveu ao fato de as raízes terem sido o órgão que mais acumulou Na^+ e que apresentou as maiores reduções nos teores de K^+ (Figura 9). Em comparação às demais fontes de N, plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram maiores aumentos na relação Na^+/K^+ em condições de salinidade, sendo esse efeito mais pronunciado na parte aérea (folhas e caules), aos 14 dias de estresse. Resultados semelhantes foram observados também em trigo e em *Leptochloa fusca* (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; MAHMOOD; KAISER, 2003).

A salinidade e as diferentes fontes de N alteraram significativamente a absorção e a distribuição de Cl^- nas plantas de girassol (Figura 10). Nas folhas, em ambos os tempos de estresse, os maiores aumentos nos teores de Cl^- , com o estresse salino, foram observados nas plantas tratadas com NO_3^- , seguidas daquelas nutridas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ e somente NH_4^+ ; essas últimas plantas apresentaram os maiores teores de Cl^- , tanto em condições controle como de salinidade, em comparação com os demais tratamentos de N (Figura 10A). Resposta semelhante foi observada nos caules, porém nesse órgão os teores de Cl^- das plantas nutridas com NH_4^+ , aos 14 dias, não foram alterados significativamente pela salinidade (Figura 10B).

Nas raízes, em ambos os tempos de estresse, os maiores aumentos nos teores de Cl^- em função da salinidade foram observados nas plantas nutridas com NO_3^- (Figura 10C).

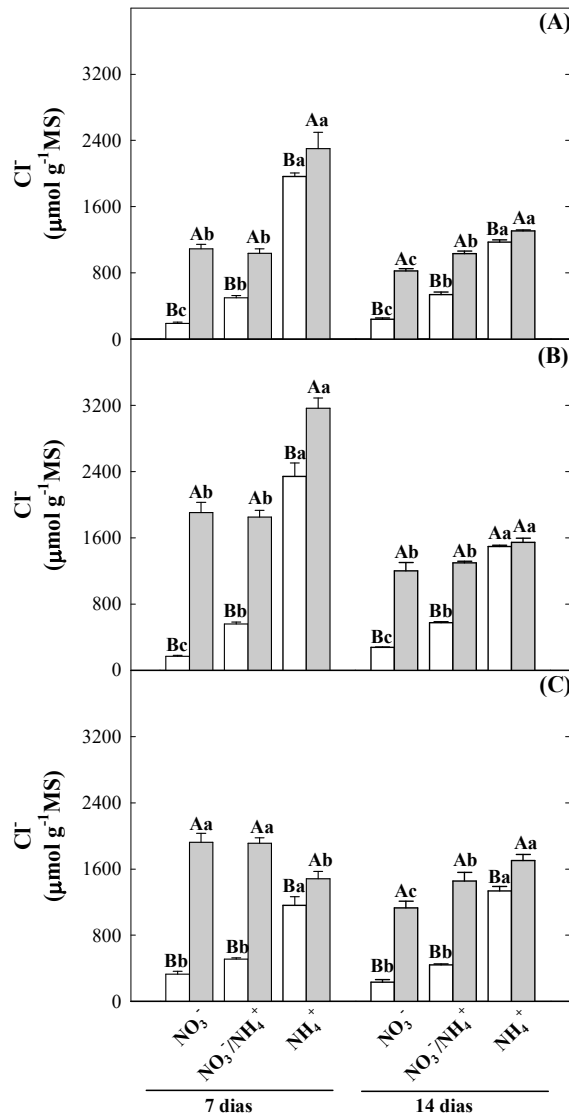
Além disso, aos 7 dias, plantas estressadas e nutridas com NH_4^+ acumularam menos Cl^- que as das demais fontes de N, sob as mesmas condições, contudo, aos 14 dias, ainda em condições de estresse, essas plantas acumularam mais Cl^- , seguidas das tratadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, e por fim, das tratadas com apenas NO_3^- (Figura 10C).

Figura 9. Relação Na^+/K^+ em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10. Teores de Cl^- em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Em termos quantitativos, os íons Cl^- acumularam-se mais nas raízes e nos caules do que nas folhas, evidenciando a capacidade das plantas de girassol de limitar o transporte desse íon para os tecidos foliares. Esse controle tem sido proposto como uma característica de tolerância particularmente importante em glicófitas (MUNNS, 2002) e envolve processos que minimizam o transporte de sais das raízes para a parte aérea ou que maximizam sua absorção no xilema radicular e caulinar (PARANYCHIANAKIS; CHARTZOULAKIS, 2005).

A salinidade aumentou a eficiência de absorção de Cl^- (EA_{Cl}) quando as plantas de girassol foram nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em ambos os tempos de estresse; nas plantas nutridas com NH_4^+ , houve redução da EA_{Cl} aos 7 dias de estresse salino,

e essa eficiência manteve-se inalterada aos 14 dias de estresse (Tabela 4). Nos dois tempos de estresse, as plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram as maiores EA_{Cl} , seguida daquelas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, e por fim, das nutridas com NO_3^- , sendo isso observado tanto em condições controle, quanto de salinidade (Tabela 4).

Tabela 4. Eficiências de absorção (EA_{Cl}) e de transporte (ET_{Cl}) de Cl^- em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (NaCl a 0 mM) ou de estresse salino (NaCl a 75 mM) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$).

NaCl (mM)	EA_{Cl} ($\mu\text{mol Cl}^- \text{mg}^{-1}$ massa seca de raiz)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	1,060 Bc	2,563 Bb	11,621 Aa	1,109 Bc	2,838 Bb	7,062 Aa
75	6,115 Ab	6,556 Ab	9,832 Ba	3,943 Ac	5,450 Ab	7,176 Aa

NaCl (mM)	ET_{Cl} ($\mu\text{mol Cl}^-$ parte aérea μmol^{-1} Cl^- planta)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	0,525 Ac	1,018 Ab	1,805 Aa	1,731 Aab	2,082 Aa	0,958 Ab
75	0,764 Ab	0,704 Bb	1,705 Aa	0,941 Ba	0,801 Ba	0,762 Aa

Fonte: Elaborada pela autora.

A eficiência de transporte de Cl^- (ET_{Cl}) foi reduzida pela salinidade nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, aos 7 e 14 dias de estresse, e nas plantas nutridas com NO_3^- , aos 14 dias (Tabela 4). Sob condições salinas, a fonte de N influenciou a ET_{Cl} apenas aos 7 dias de estresse, em cujo tempo as plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram a maior ET_{Cl} (Tabela 4).

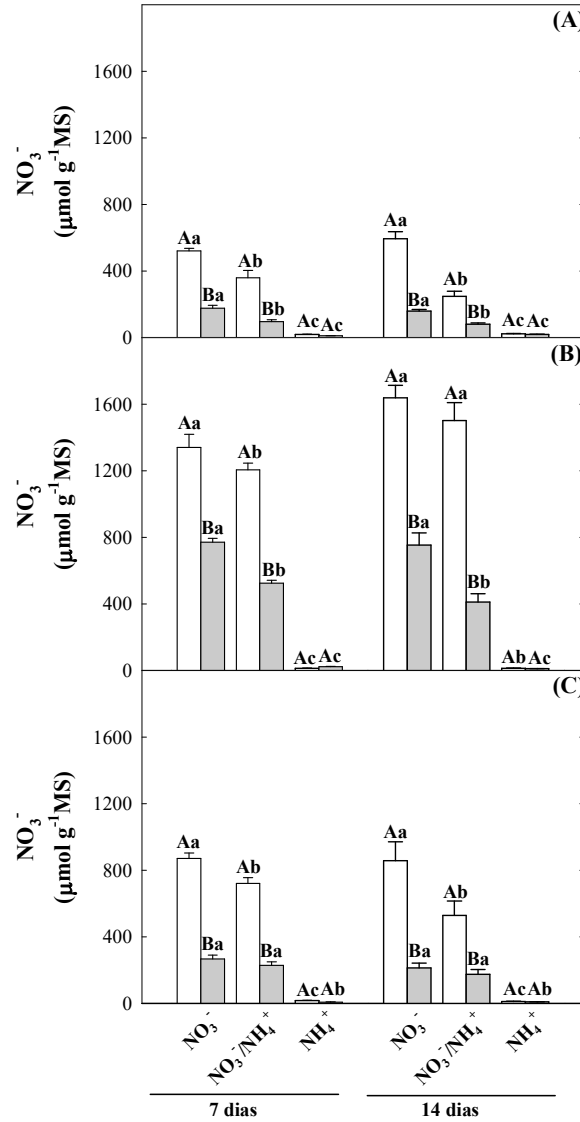
O acúmulo de Cl^- e Na^+ em plantas submetidas ao estresse salino tem um efeito negativo no metabolismo vegetal (MUNNS; TERMAAT, 1986). Dessa forma, a toxicidade do Cl^- pode explicar, pelo menos em parte, a redução no crescimento observada em condições de salinidade. Variações no acúmulo de Cl^- têm sido usadas para explicar diferenças na tolerância ao NaCl entre as espécies (MARSCHNER, 1995), entretanto o acúmulo desse íon também é dependente da fonte de N a que as plantas são submetidas. Quando as plantas foram nutridas com NO_3^- , houve variações mais evidentes nos teores de Cl^- das diversas partes das plantas de girassol, em função da salinidade (Figura 10). Plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ acumularam menos Cl^- nas diversas partes das plantas e tiveram menor EA_{Cl} , em ambos os tempos de estresse, em comparação com aquelas nutridas com NH_4^+ . Com esses resultados, verifica-se que a presença de NO_3^- no meio de cultivo reduz a absorção de Cl^- , que é um íon tóxico, aumentando consequentemente a resistência das plantas ao estresse salino (DING *et al.*, 2010; FEIJÃO *et al.*, 2013). Por outro lado, quando as plantas tiveram o

NH_4^+ como única fonte de N, houve maior acúmulo de Cl^- nas diversas partes da planta e maior EA_{Cl} , tanto em condições controle, quanto de salinidade (Figura 10). Esses resultados estão relacionados ao fato de as plantas nutridas com NH_4^+ possuírem um pH citosólico baixo, uma condição que aumenta a absorção de ânions (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005). Sob condições salinas, a nutrição com NH_4^+ estimula o influxo de Cl^- , aumentando a toxicidade associada com o acúmulo desse íon (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005; PEUKE; JESCHKE; HARTUNG, 1998). Resultados semelhantes já foram reportados anteriormente em girassol (ASHRAF; SULTANA, 2000) e também em outras espécies, tais como ervilha (FIGUEIRA; CALDEIRA, 2005) e *Leptochloa fusca* (MAHMOOD; KAISER, 2003).

Os teores de NO_3^- foram reduzidos pela salinidade nos diversos órgãos das plantas cultivadas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, não tendo havido efeito desse estresse nas plantas tratadas apenas com NH_4^+ (Figura 11). Nas folhas e nos caules, pôde-se observar que as plantas nutridas com NO_3^- apresentaram os maiores teores desse íon, tanto em condições controle, quanto de estresse salino, seguida das tratadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ e, por fim, daquelas tratadas com NH_4^+ , as quais, como esperado, apresentaram baixíssimas concentrações de NO_3^- (Figura 11A e 11B). Nas folhas, aos 7 dias de estresse, a maior redução nos teores de NO_3^- , causada pela salinidade, foi observada nas plantas cultivadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (73%), enquanto que, aos 14 dias, as plantas nutridas com NO_3^- foram as que mais reduziram os teores desse íon, em decorrência da salinidade (Figura 11A). Nos caules, em ambos os tempos, as plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apresentaram as maiores reduções nos teores de NO_3^- com o estresse salino, sendo essas reduções de 56%, aos 7 dias, e de 73%, aos 14 dias, em comparação aos respectivos controles (Figura 11B). Nas raízes, plantas nutridas com NO_3^- apresentaram as maiores reduções nos teores desse íon com a salinidade, em ambos os tempos de estresse (Figura 11C). Além disso, pôde-se observar que, nesse órgão, plantas cultivadas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ acumularam NO_3^- em níveis semelhantes em seus tecidos, em condições de salinidade.

A eficiência de absorção de NO_3^- (EA_{NO_3}) em ambos os tempos de estresse foi reduzida pelo estresse salino nas plantas nutridas com NO_3^- ou com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Tabela 5). As maiores reduções causadas pela salinidade na EA_{NO_3} foram observadas nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em ambos os tempos de exposição à salinidade, sendo essas reduções de 69%, aos 7 dias, e de 76%, aos 14 dias, em comparação aos respectivos controles. A maior EA_{NO_3} , aos 7 dias de estresse, foi observada nas plantas que tiveram NO_3^- como única fonte de N, contudo, aos 14 dias, isso também pôde ser observado naquelas cultivadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, tanto em condições controle, como de

Figura 11. Teores de NO_3^- em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5. Eficiências de absorção (EA_{NO_3}) e de transporte (ET_{NO_3}) de NO_3^- em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (NaCl a 0 mM) ou de estresse salino (NaCl a 75 mM) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$).

NaCl (mM)	EA_{NO_3} ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ mg}^{-1}$ massa seca de raiz)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	3,760 Aa	3,289 Ab	0,106 Ac	4,816 Aa	4,890 Aa	0,097 Ab
75	1,410 Ba	1,018 Bb	0,081 Ac	1,458 Ba	1,188 Ba	0,083 Ab

NaCl (mM)	ET_{NO_3} ($\mu\text{mol NO}_3^-$ parte aérea μmol^{-1} NO_3^- planta)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+	NO_3^-	$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	NH_4^+
0	0,922 Ba	0,914 Aa	1,090 Ba	1,478 Bb	1,798 Aab	2,410 Aa
75	1,653 Aa	1,125 Aa	1,529 Aa	2,295 Aa	1,680 Ab	1,949 Aa

Fonte: Elaborada pela autora.

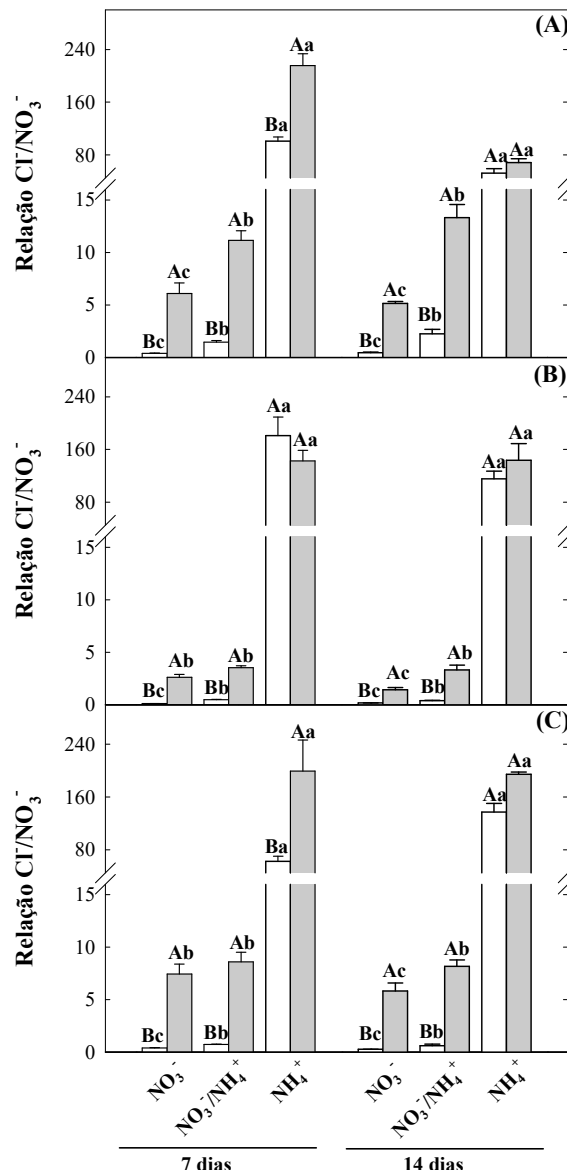
salinidade (Tabela 5). Nas plantas nutridas com NH_4^+ , não houve efeito da salinidade e, como esperado, a EA_{NO_3} foi muito baixa (Tabela 5). De maneira geral, a eficiência de transporte de NO_3^- (ET_{NO_3}) aumentou com o estresse salino, aos 7 dias, não tendo havido efeito da fonte de N sobre essa variável. Aos 14 dias, por sua vez, a ET_{NO_3} aumentou com a salinidade apenas nas plantas tratadas com NO_3^- , e em condições salinas, a maior ET_{NO_3} foi observada nas plantas nutridas com NO_3^- e com NH_4^+ (Tabela 5).

Os teores de NO_3^- nos diversos órgãos das plantas de girassol e a EA_{NO_3} foram reduzidos pela salinidade nos diferentes tratamentos com N, com exceção das plantas nutridas com NH_4^+ , que apresentaram baixíssimas concentrações desse íon e foram pouco afetadas pelo estresse salino (Figura 11). O efeito negativo da salinidade na absorção de NO_3^- já foi relatado em várias espécies com tolerância diferencial ao estresse salino, sendo isso devido à competição direta entre os íons Cl^- e NO_3^- pelo mesmo transportador, a um menor carregamento de NO_3^- através do xilema radicular ou a alterações na integridade da membrana (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; ARAGÃO *et al.*, 2010; BARHOUMI *et al.*, 2010; FEIJÃO *et al.*, 2013; MANSOUR; SALAMA, 2004).

O estresse salino aumentou a relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ nas diversas partes das plantas de girassol, contudo isso dependeu da fonte de N empregada (Figura 12). Nas folhas, essa relação aumentou com a substituição gradativa do NO_3^- por NH_4^+ na solução nutritiva. Dessa forma, tanto em condições controle, como de salinidade, as plantas nutridas com NH_4^+ foram as que apresentaram os maiores valores dessa relação (Figura 12A). Em ambos os tempos de coleta, entretanto, o efeito da salinidade sobre a relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ foi mais evidente nas plantas nutridas com NO_3^- , nas quais essa variável aumentou aproximadamente 16 vezes, aos 7 dias, e 11 vezes, aos 14 dias, em comparação aos seus respectivos controles. A relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ nas folhas das plantas nutridas com NH_4^+ foi a menos afetada pelo estresse, em comparação a dos demais tratamentos de N; ainda nessas plantas, a relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ das folhas aumentou aproximadamente duas vezes, aos 7 dias de estresse (Figura 12A). Nos caules, os maiores incrementos na relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ aos 7 dias de estresse, em função da salinidade, foram observados nas plantas nutridas com NO_3^- , porém, aos 14 dias, a salinidade aumentou em uma mesma proporção (aproximadamente 8 vezes) a relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ nas plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 12B). Em ambos os tempos avaliados, não se verificou qualquer efeito da salinidade sobre a relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ nos caules das plantas nutridas com NH_4^+ , e essas plantas foram as que apresentaram os maiores valores dessa relação nesses órgãos, tanto em condições controle como de salinidade (Figura 12B). Nas raízes, semelhantemente às folhas, os maiores incrementos causados pela salinidade na

relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ foram observados nas plantas nutridas com NO_3^- , e a essa relação foi menos afetada pelo estresse nas plantas nutridas com NH_4^+ (Figura 12C). Esses resultados sugerem que uma maior concentração de NO_3^- no meio de cultivo reduz a absorção e o acúmulo de Cl^- (DING *et al.*, 2010; FEIJÃO *et al.*, 2013).

Figura 12. Relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.

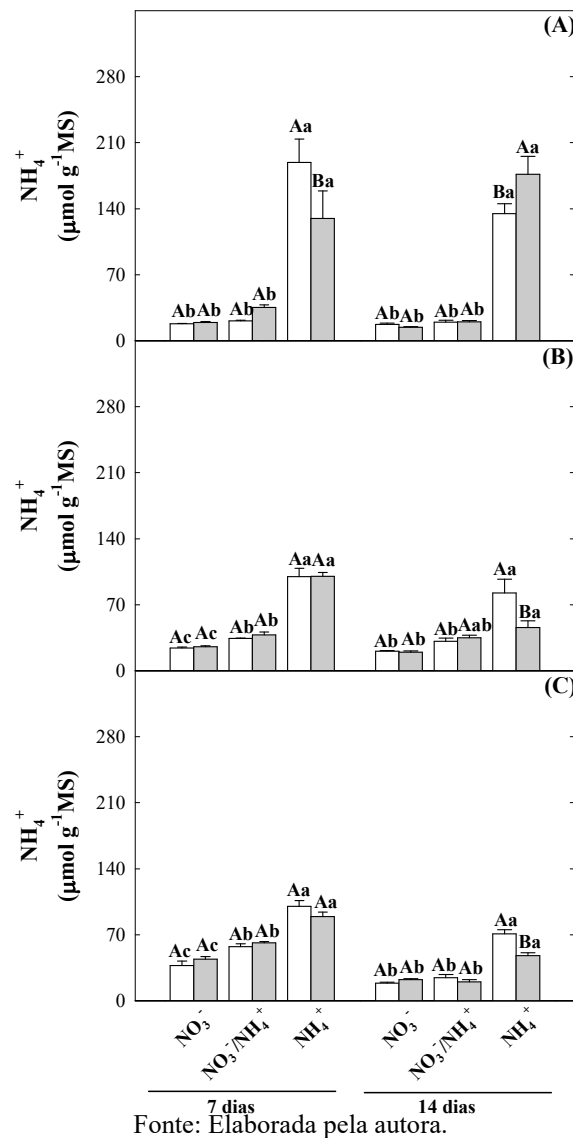


Fonte: Elaborada pela autora.

De maneira geral, os teores de NH_4^+ nos diversos órgãos das plantas de girassol foram pouco afetados pela salinidade (Figura 13). Além disso, plantas que tiveram NH_4^+ como única fonte de N acumularam mais esse íon (Figura 13). Nas folhas, a salinidade afetou os teores de NH_4^+ apenas nas plantas nutridas com esse íon, nas quais houve redução de 32%

nesses teores, aos 7 dias, e aumento de 31%, aos 14 dias, em comparação aos seus respectivos controles (Figura 13A). Convém ressaltar que, entre os órgãos das plantas nutridas com NH_4^+ , as folhas foram os que mais acumularam esse íon (Figura 13). De maneira semelhante ao ocorrido nas folhas, os teores de NH_4^+ nos caules e nas raízes foram afetados pela salinidade apenas nas plantas nutridas com esse íon, contudo isso só pôde ser verificado ao final do experimento, em que houve reduções de 44%, nos caules, e de 32%, nas raízes dessas plantas, em razão da salinidade (Figura 13B e 13C).

Figura 13. Teores de NH_4^+ em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Como esperado, durante todo o período experimental, as maiores eficiências de absorção de NH_4^+ (EA_{NH_4}) foram observadas nas plantas que tiveram esse íon como única fonte de N (Tabela 6). Aos 7 dias de estresse, a salinidade reduziu a EA_{NH_4} das plantas

nutridas com esse íon, ao passo que, aos 14 dias de estresse, houve redução da EA_{NH_4} tanto nas plantas nutridas com NO_3^- , quanto naquelas nutridas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ (Tabela 6). De modo semelhante a EA_{NH_4} , em quaisquer tempos de estresse, as plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram as maiores eficiências de transporte desse íon (ET_{NH_4}), havendo reduções pela salinidade somente nessas plantas, aos 7 dias, e naquelas nutridas com NO_3^- , ao final do experimento (Tabela 6). A inibição da absorção do íon NH_4^+ pela salinidade pode ser devida à competição direta com o Na^+ ou à despolarização da membrana plasmática causada pelas altas concentrações de NaCl (HAWKINS; LEWIS, 1993). Contudo, os teores de NH_4^+ nas diversas partes das plantas foram afetados pela salinidade apenas naquelas nutridas com esse íon (Figura 13). Diferentemente do encontrado neste estudo, houve aumentos nos teores de NH_4^+ com a salinidade em plantas de soja, que independeram das fontes de N estudadas (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992).

Tabela 6. Eficiências de absorção (EA_{NH_4}) e de transporte (ET_{NH_4}) de NH_4^+ em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (NaCl a 0 mM) ou de estresse salino (NaCl a 75 mM) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$).

NaCl (mM)	EA_{NH_4} ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ mg}^{-1}$ massa seca de raiz)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	NO_3^-/NH_4^+	NH_4^+	NO_3^-	NO_3^-/NH_4^+	NH_4^+
0	0,107 Ab	0,159 Ab	0,936 Aa	0,087 Ac	0,158 Ab	0,532 Aa
75	0,104 Ab	0,181 Ab	0,582 Ba	0,067 Bc	0,118 Bb	0,593 Aa

NaCl (mM)	ET_{NH_4} ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ parte aérea } \mu\text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+ \text{ planta}$)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	NO_3^-/NH_4^+	NH_4^+	NO_3^-	NO_3^-/NH_4^+	NH_4^+
0	0,571 Ab	0,454 Ab	1,702 Aa	0,970 Ab	1,043 Ab	3,116 Aa
75	0,480 Ab	0,564 Ab	1,303 Ba	0,748 Bc	1,323 Ab	3,034 Aa

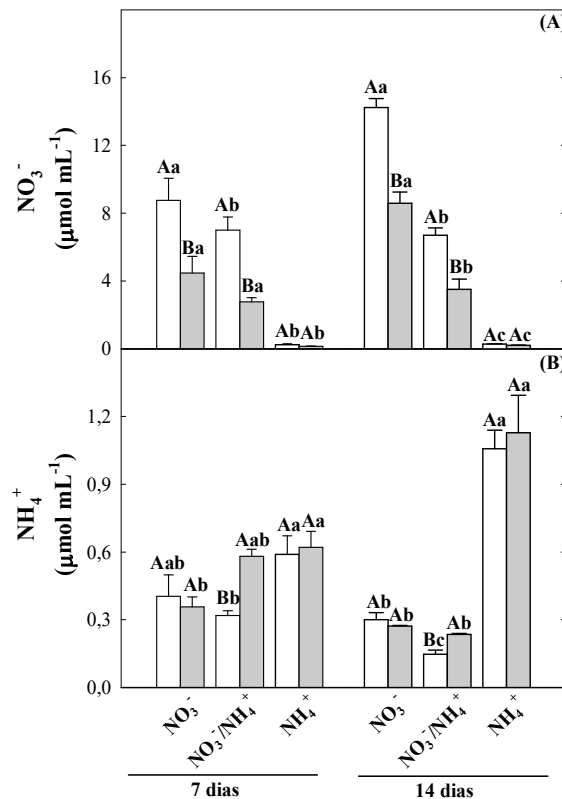
Fonte: Elaborada pela autora.

Neste estudo foi observado que as plantas nutridas com NH_4^+ acumularam mais esse íon do que as plantas das demais fontes de N, e que não houve diferenças significativas nesses teores entre as plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura NO_3^-/NH_4^+ (Figura 13). Em plantas de ervilha, os teores de NH_4^+ aumentaram com o maior suprimento desse íon na solução nutritiva (CRUZ *et al.*, 2011). Nesse mesmo sentido, em *Camellia sinensis* e em *Catharanthus roseus*, foi verificado que plantas nutridas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ acumularam bem mais NH_4^+ do que aquelas nutridas com NO_3^- (GUO; ZU; TANG, 2012; RUAN *et al.*, 2007). Dessa maneira, é provável que, nas plantas de girassol nutridas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ , esse íon tenha sido destinado para outras rotas metabólicas, tais como a assimilação de NH_4^+ em aminoácidos.

4.7 Teores de NO_3^- e NH_4^+ na seiva do xilema

Os efeitos da salinidade e das diferentes fontes de N sobre a concentração de NO_3^- e NH_4^+ na seiva xilemática de plantas de girassol estão mostrados na Figura 14. Em ambos os tempos analisados, a salinidade reduziu a concentração de NO_3^- da seiva xilemática das plantas nutridas com esse íon ou com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, não tendo havido qualquer efeito desse estresse na concentração de NO_3^- das plantas nutridas com NH_4^+ (Figura 14A).

Figura 14. Teores de NO_3^- (A) e NH_4^+ (B) na seiva do xilema de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

As maiores reduções nos teores de NO_3^- na seiva do xilema, em decorrência do estresse salino, foram observadas nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, sendo essas reduções de 60%, aos 7 dias, e de 48%, aos 14 dias, em comparação aos respectivos controles. Além disso, foi observado, principalmente aos 14 dias, que a concentração de NO_3^- na seiva do xilema diminuiu à medida que a concentração desse íon no meio de cultivo foi reduzida, tanto em condições controle, quanto de estresse salino (Figura 14A). Isso pode ser explicado pelo fato de o íon NO_3^- , além de ser um nutriente, atuar como sinalizador bioquímico sobre a expressão de genes relacionados com o seu transporte na membrana celular (FORDE, 2002).

Dessa maneira, a maior expressão desses genes determina o aumento da quantidade de NO_3^- absorvido pela planta, em função da disponibilidade desse íon no meio externo.

Como visto, a salinidade reduziu a translocação de NO_3^- na seiva do xilema das plantas de girassol. Resultados semelhantes foram verificados por outros autores (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; ARAGÃO *et al.*, 2010). A redução do fluxo de íons na seiva xilemática, causada pela salinidade, ocorre devido aos efeitos osmóticos e tóxicos desse estresse, os quais podem romper a integridade das membranas radiculares e, conseqüentemente, dificultar o carregamento de nutrientes no xilema da raiz (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; ARAGÃO *et al.*, 2010). No caso do NO_3^- , outro fator é adicionado quando as plantas encontram-se em condições de salinidade: a competição direta entre os íons Cl^- e NO_3^- pelo mesmo transportador (ARAGÃO *et al.*, 2010; MILLER; CRAMER, 2004; RUBINIGG *et al.*, 2005).

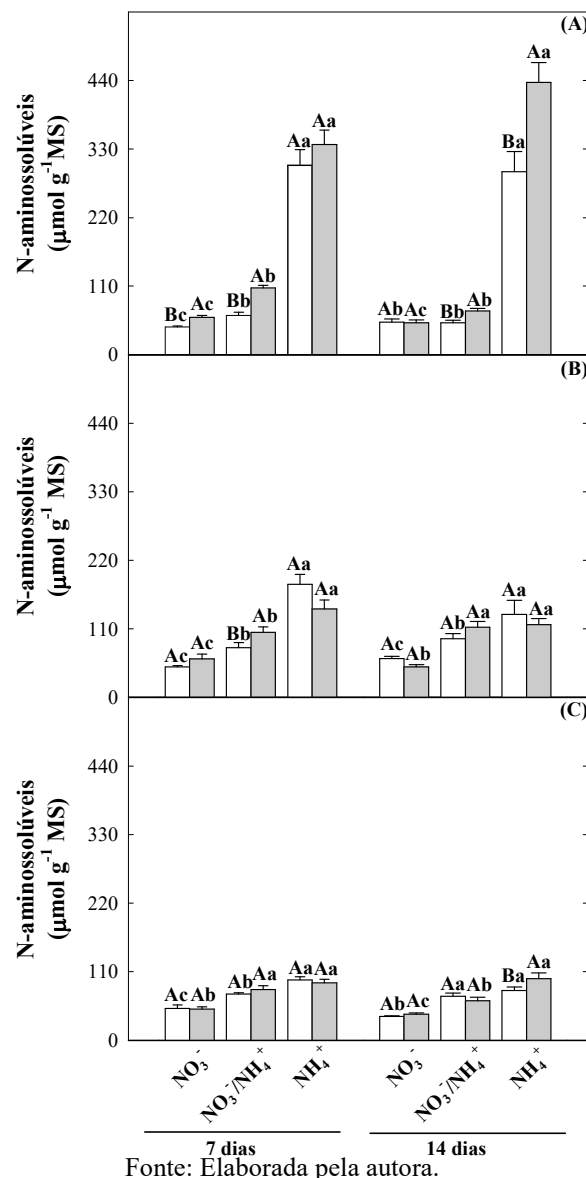
A salinidade pouco influenciou a concentração de NH_4^+ na seiva xilemática de plantas de girassol; houve aumentos nessa variável apenas nas plantas cultivadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 14B). A nutrição nitrogenada baseada unicamente no NH_4^+ resultou em concentrações elevadas desse íon na seiva xilemática, sendo isso mais pronunciado com o aumento do período de experimental. Esses resultados corroboram aqueles encontrados para os teores de NH_4^+ nas folhas e caules de plantas de girassol (Figura 13A e 13B). O maior acúmulo e transporte de NH_4^+ para a parte aérea, observado nas plantas nutridas unicamente com esse íon, parece ser uma razão significativa para o menor crescimento dessas plantas (Figura 1 e 2), o qual pode ser justificado pela toxidez do NH_4^+ . Várias plantas apresentam sintomas de toxidez quando a fonte de N é exclusivamente o NH_4^+ (EHLTING *et al.*, 2007; FEIJÃO, 2009; FRECHILLA *et al.*, 2001; GERENDÁS *et al.*, 2007), e entre os principais sintomas dessa toxidez, está a inibição geral do crescimento (BRITTO; KRONZUCKER, 2002).

4.8 Teores de N-aminossolúveis

De maneira geral, os teores de N-aminossolúveis foram pouco influenciados pela salinidade, contudo variaram significativamente em função da fonte de N empregada (Figura 15). Nas folhas, os teores de N-aminossolúveis foram aumentados pelo estresse salino, aos 7 dias, nas plantas nutridas com NO_3^- (34%) e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (70%), em comparação aos seus respectivos controles (Figura 15A). Aos 14 dias, os maiores aumentos causados pela salinidade foram observados nas plantas nutridas com NH_4^+ (49%). Nos caules, a salinidade elevou os teores de N-aminossolúveis apenas das plantas que foram nutridas com

a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, aos 7 dias (Figura 15B), enquanto que, nas raízes, houve uma pequena elevação nesses teores (24%) apenas nas plantas nutridas com NH_4^+ , aos 14 dias de estresse (Figura 15C). Com relação às fontes de nitrogênio, de maneira geral, plantas nutridas com NH_4^+ apresentaram os maiores teores de N-aminossolúveis, quando comparadas com as dos demais tratamentos de N, sendo isso observado, sobretudo nas folhas (Figura 15A, 15B e 15C). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de ervilha, milho e sorgo, nas quais também houve maior acúmulo de N-aminossolúveis quando as plantas foram nutridas com NH_4^+ , em comparação com as cultivadas apenas com NO_3^- (FEIJÃO, 2009; FRECHILLA *et al.*, 2001; MIRANDA *et al.*, 2013).

Figura 15. Teores de N-aminossolúveis em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Neste estudo, foi também observado que plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em comparação às nutridas com NO_3^- , acumularam mais N-aminossolúveis (Figura 15). Guo, Zu e Tang (2012) sugeriram que plantas cultivadas em soluções contendo NH_4^+ têm uma maior quantidade de N disponível em comparação com as cultivadas apenas com NO_3^- , e isso, provavelmente, deve ter contribuído para o menor crescimento observado nas plantas de girassol nutridas com NO_3^- , em comparação com as nutridas com $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, principalmente em condições de estresse, uma vez que nessas condições ocorre uma competição direta entre o Cl^- e NO_3^- , reduzindo, portanto, a absorção da única fonte de N disponível para essas plantas na solução nutritiva, resultando, conseqüentemente, em uma menor quantidade de N nos tecidos.

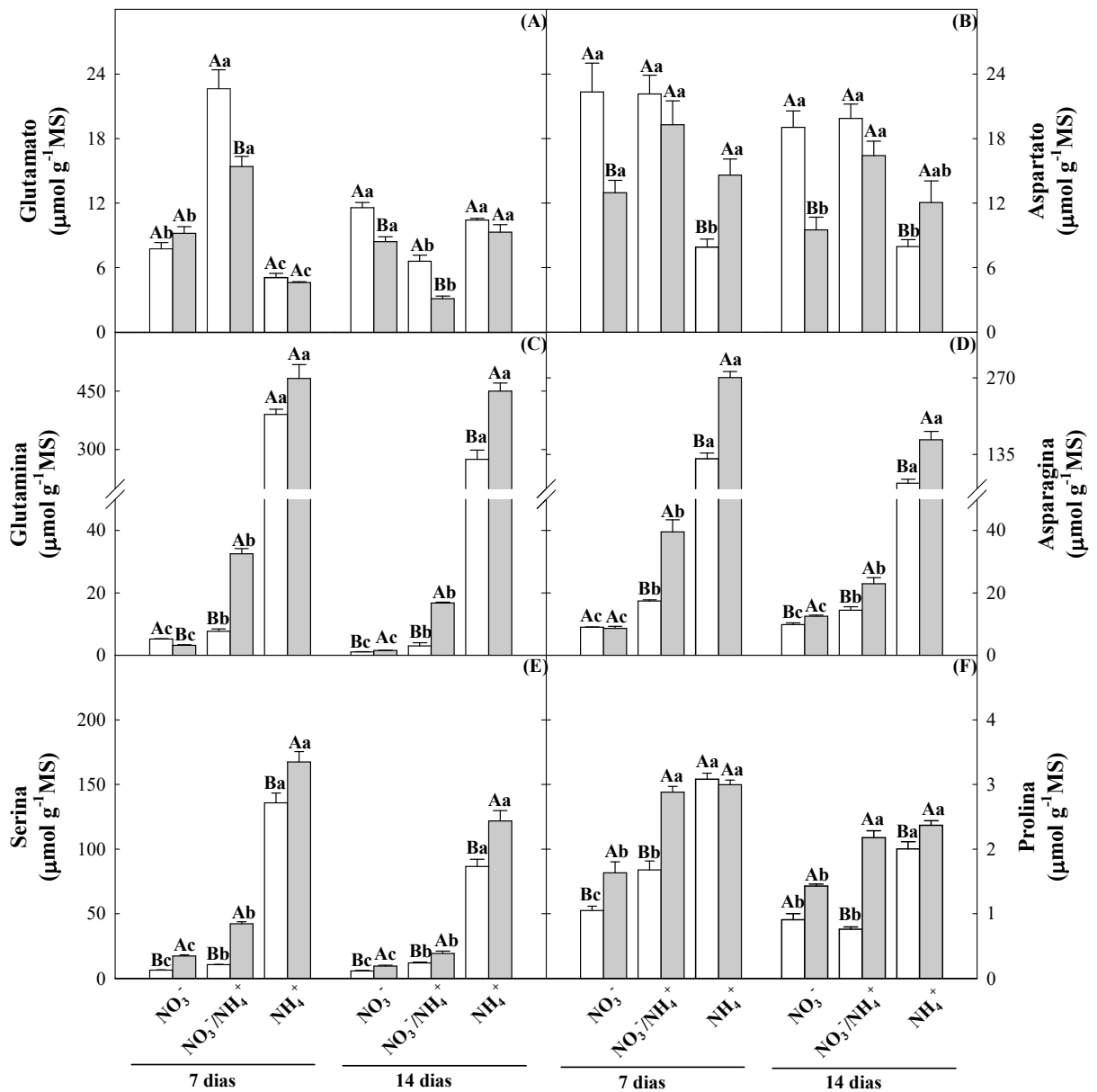
O acúmulo de aminoácidos livres em tecidos de plantas sob salinidade é comumente reportado como uma resposta ao estresse salino, sendo isso observado tanto para genótipos sensíveis, como tolerantes aos sais (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004; AZEVEDO NETO; PRISCO; GOMES-FILHO, 2009; DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007). O papel da maioria desses N-aminossolúveis que são acumulados ainda não está bem esclarecido, mas é provável que esses compostos, quando presentes em altas concentrações, contribuam para processos de regulação osmótica e de osmoproteção. Além de aumentar a pressão osmótica do citosol, baixando seu potencial hídrico, eles podem proteger macromoléculas, ou servir como fonte de N e energia, podendo também atenuar os efeitos do estresse oxidativo por eliminar EROs (MANSOUR, 2000). O aumento da concentração de aminoácidos livres em condições de estresse salino está, geralmente, relacionado com a degradação de proteína e/ou com a inibição da síntese de proteína (NGUYEN *et al.*, 2005) e pode também ser um mecanismo de prevenção ao acúmulo de NH_4^+ livre em níveis tóxicos na planta nessas condições (GIVAN, 1979). Neste estudo, o aumento nos teores de NH_4^+ com a salinidade, verificado nas folhas das plantas cultivadas com esse íon, aos 14 dias (Figura 13), foi acompanhado por um aumento semelhante de N-aminossolúveis nessas mesmas plantas (Figura 15).

4.9 Teores de aminoácidos

Os teores dos aminoácidos glutamato, aspartato, glutamina, asparagina, serina e prolina foram determinados em folhas de girassol. Esses teores, de maneira geral, foram afetados pela salinidade e pelas fontes de N empregadas (Figura 16). Aos 7 dias, os teores de glutamato foram afetados pela salinidade apenas nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ nas quais houve uma redução de 32% devido ao estresse (Figura 16A). Apesar disso,

essas plantas foram as que mais acumularam esse aminoácido, tanto em condições controle, como de estresse salino (Figura 16). Aos 14 dias, os teores de glutamato foram reduzidos pela salinidade tanto nas plantas nutridas com NO_3^- quanto naquelas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 16A).

Figura 16. Teores de glutamato (A), aspartato (B), glutamina (C), asparagina (D), serina (E) e prolina (F) de folhas de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Durante todo o período experimental, a variação dos teores de aspartato frente à salinidade dependeu da fonte de N (Figura 16B). Nas plantas nutridas com NO_3^- , houve reduções nos teores de aspartato com o estresse; já nas plantas tratadas com NH_4^+ , a

salinidade aumentou os teores desse aminoácido, ao passo que, nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, não houve qualquer efeito do estresse salino nos teores de aspartato (Figura 16B). Aos 7 dias, plantas nutridas com NO_3^- tiveram seus teores de glutamina reduzidos pela salinidade, enquanto que, nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, houve aumento de aproximadamente três vezes nos teores desse aminoácido com o estresse (Figura 16C). Aos 14 dias, a salinidade elevou os teores de glutamina em todos os tratamentos de N, e os maiores aumentos nesses teores foram observados nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (cerca de quatro vezes, em relação ao controle) (Figura 16C).

Aos 7 dias, os teores de asparagina foram afetados pela salinidade de maneira similar nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ e com NH_4^+ ; nesses casos, houve aumento médio de aproximadamente 100%, em comparação aos respectivos controles (Figura 16D). Já aos 14 dias, houve aumentos nos teores desse aminoácido com a salinidade em todos os tratamentos de N, sendo os maiores aumentos verificados em plantas tratadas com NH_4^+ . Os teores de serina foram aumentados pelo estresse salino em todos os tratamentos de N e durante todo o período experimental (Figura 16E). Aos 7 dias, os maiores aumentos nos teores de serina foram observados nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (cerca de três vezes). No final do experimento, os teores desse aminoácido foram aumentados pela salinidade, de maneira mais pronunciada, nas plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, sendo esses aumentos de 65%, em média, em comparação aos controles (Figura 16E). Em ambos os tempos analisados, os teores de prolina foram aumentados pela salinidade nas plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, enquanto que, nas plantas nutridas com NH_4^+ , essa mesma resposta foi observada somente aos 14 dias (Figura 16F).

Em ambos os tempos de estresse, as plantas nutridas com NH_4^+ acumularam glutamina, asparagina e serina em altas quantidades, sendo, portanto, as que mais acumularam esses aminoácidos, em comparação aos demais tratamentos de N, seguida das nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ e, por fim, daquelas nutridas com apenas NO_3^- (Figura 16C, 16D e 16E). Uma das respostas de defesa das plantas contra a toxicidade causada pelo excesso de NH_4^+ em suas células é a incorporação desse íon em aminoácidos com alta relação N/C, tais como glutamina, asparagina e prolina (BIALCZYK *et al.*, 2005; FOYER; PARRY; NOCTOR, 2003; GUO; ZU; TANG, 2012; SKOPELITIS *et al.*, 2006). Em concordância com essa afirmação, neste estudo, foram observados altos teores desses aminoácidos em plantas cultivadas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em comparação com as nutridas com apenas NO_3^- . Além disso, os teores de glutamina e asparagina foram demasiadamente maiores nas plantas nutridas apenas com NH_4^+ (Figura 16C e 16D), resultado semelhante ao encontrado por

outros autores (MAGALHÃES; HUBER; TSAI, 1995). Esse mecanismo, porém, não foi suficiente para desintoxicar as plantas de girassol sob essa nutrição. De modo contrário, plantas de *Leptochloa fusca* cultivadas com NH_4^+ mantiveram seu crescimento, apresentaram baixos teores desse íon nos tecidos e altos níveis de aminoácidos, quando comparadas às plantas nutridas com NO_3^- , indicando uma desintoxicação efetiva do NH_4^+ nessas plantas (MAHMOOD; KAISER, 2003). Mudanças no perfil de aminoácidos em plantas supridas com NH_4^+ são comuns, porém não podem ser estritamente apontadas como um sintoma de toxidez, já que isso é observado mesmo quando o NH_4^+ não suprime o crescimento (BRITTO; KRONZUCKER, 2002; MAHMOOD; KAISER, 2003; MIRANDA *et al.*, 2013).

O acúmulo de glutamina em condições de estresse salino foi detectado também em outras espécies (AMONKAR; KARMARKAR, 1995; EHLTING *et al.*, 2007). Tanto a rota de assimilação de NH_4^+ , como a de reassimilação desse composto gerado na fotorrespiração, aumenta a síntese de glutamina. Portanto, mudanças na fotorrespiração podem ter causado os aumentos na glutamina com o estresse salino e com a nutrição com NH_4^+ (EHLTING *et al.*, 2007). Outro produto da fotorrespiração que também aumentou sob essas duas condições foi a serina (Figura 16E). Tang *et al.* (2011) observaram que a fotorrespiração foi promovida em plantas nutridas com NH_4^+ . Em folhas de *Populus* e milho, os teores de serina foram também bastante aumentados em condições de estresse, em razão possivelmente de um aumento na fotorrespiração com a salinidade (AZEVEDO NETO; PRISCO; GOMES-FILHO, 2009; DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007). Em adição ao seu papel na fotorrespiração, a serina também é considerada um agente osmoprotetor (DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007; PATRICK; BRADLEY, 2000).

Os teores de prolina foram aumentados em condições de estresse salino nas plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, sendo os maiores aumentos causados por este estresse observados nestas últimas (Figura 16F). A prolina é cerca de 300 vezes mais solúvel em água do que outros aminoácidos e assim pode atuar como um osmólito (EHLTING *et al.*, 2007). O acúmulo de prolina já foi observado em várias espécies, em resposta ao estresse salino (AZEVEDO NETO; PRISCO; GOMES-FILHO, 2009; DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2011), inclusive em girassol (JABEEN; AHMAD, 2013). Por meio de alguns estudos, verifica-se que a prolina e outros aminoácidos desempenham importante papel no balanço osmótico de células sob estresse salino e hídrico, além de estabilizar estruturas subcelulares (membranas e proteínas) sob condições de estresse (PARIDA; DAS, 2005). O acúmulo desses compostos em plantas sob estresse salino vem

sendo proposto como marcador fisiológico durante a seleção para tolerância à salinidade (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004; AZEVEDO NETO; PRISCO; GOMES-FILHO, 2009).

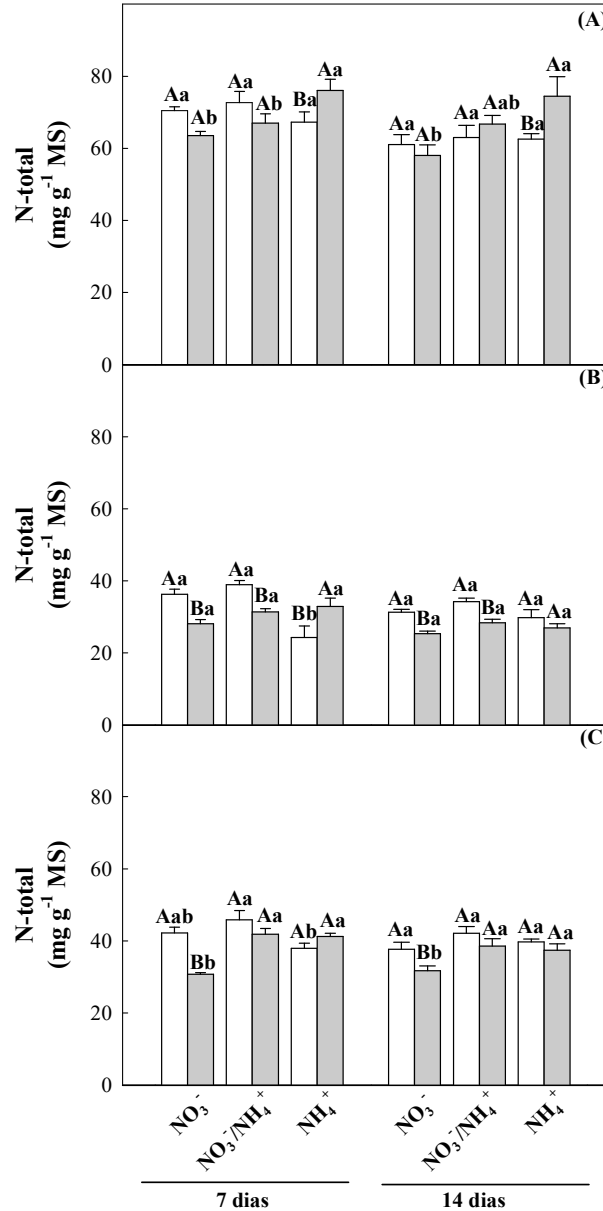
4.10 Teores de nitrogênio total e eficiência no uso do nitrogênio

Os teores de nitrogênio total (N-total) em plantas de girassol foram ora elevados pela salinidade, ora reduzidos por esse estresse (Figura 17). Nas folhas, a salinidade afetou os teores de N-total apenas nas plantas nutridas com NH_4^+ , nas quais esses teores aumentaram 16% com o estresse, em média, durante todo o período experimental (Figura 17A). Além disso, os maiores teores de N-total foram verificados nas plantas nutridas com NH_4^+ e sob condições de estresse, em comparação com as demais nutrições de N estudadas. Nos caules, em ambos os tempos de estresse, a salinidade reduziu os teores de N-total das plantas cultivadas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, sendo essas reduções de, em média, 20%, aos 7 dias, e de 18%, aos 14 dias, em relação aos respectivos controles (Figura 17B).

Nas plantas nutridas com NH_4^+ , a salinidade aumentou os teores de N-total em 24%, aos 7 dias de estresse. Nas raízes, em ambos os tempos de coleta, apenas as plantas nutridas com NO_3^- tiveram os teores de N-total afetados pela salinidade, sendo observadas reduções de 27%, aos 7 dias, e de 16%, aos 14 dias (Figura 17C). Além disso, plantas estressadas e nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ou apenas NH_4^+ acumularam mais nitrogênio em suas raízes do que aquelas nutridas com NO_3^- , sob as mesmas condições, durante todo o período experimental. Esses resultados são concordantes com os encontrados nos teores de N-aminossolúveis (Figura 15) e aminoácidos (Figura 16), pois reforçam a menor disponibilidade de N nas plantas de girassol nutridas apenas com NO_3^- , em condições de estresse. Contudo, as respostas das plantas à salinidade e às fontes de N observadas nos teores de N-aminossolúveis e aminoácidos relacionaram-se parcialmente com os teores de N-total. Além disso, vale ressaltar que as alterações no crescimento observadas em plantas de girassol nutridas com diferentes fontes de N e sob salinidade não puderam ser correlacionadas com os teores de N-total (Figuras 1, 2 e 17).

Em plantas de milho e trigo, uma maior concentração de N foi encontrada nas plantas nutridas com NH_4^+ , comparadas com as demais fontes de N (FEIJÃO, 2009; LIPS *et al.*, 1990). Contudo, em outros estudos, a concentração de N não dependeu da fonte de N empregada (EHLTING *et al.*, 2007; IRSHAD; ENEJI; YASUDA, 2008).

Figura 17. Teores de nitrogênio (N) total em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

A eficiência de utilização do nitrogênio (EU_N) diferiu de acordo com a forma de N utilizada e com o estresse salino (Tabela 7). A salinidade reduziu a EU_N de plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura NO_3^-/NH_4^+ , em ambos os tempos de estresse, sendo esse efeito mais pronunciado em plantas nutridas apenas com NO_3^- . Aos 14 dias, plantas cultivadas sob nutrição combinada de N apresentaram a maior EU_N em condições de salinidade. O estresse salino não alterou a EU_N de plantas de girassol nutridas com NH_4^+ , porém essas plantas apresentaram os menores valores dessa variável, em comparação aos demais tratamentos de

N. A salinidade reduz a EU_N principalmente devido a seus efeitos na absorção e no metabolismo de N e na síntese e na degradação de proteínas (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; DLUZNIEWSKA *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2005). A maior EU_N em plantas nutridas com mistura NO_3^-/NH_4^+ em condições de salinidade foi devido a maior biomassa observada nessas plantas. Outros trabalhos também encontraram maiores EU_N em regime de N combinado (WANG; BELOW, 1992; IRSHAD; ENEJI; YASUDA, 2008).

Tabela 7. Eficiência de utilização do nitrogênio (EU_N) em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (NaCl a 0 mM) ou de estresse salino (NaCl a 75 mM) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$).

NaCl (mM)	EU_N ($g^2 g^{-1}$ de N)					
	7 dias			14 dias		
	NO_3^-	NO_3^-/NH_4^+	NH_4^+	NO_3^-	NO_3^-/NH_4^+	NH_4^+
0	24,021 Aa	27,578 Aa	12,077 Ab	131,783 Aa	151,129 Aa	26,720 Ab
75	18,367 Ba	21,691 Ba	9,370 Ab	74,619 Bb	97,462 Ba	26,023 Ac

Fonte: Elaborada pela autora.

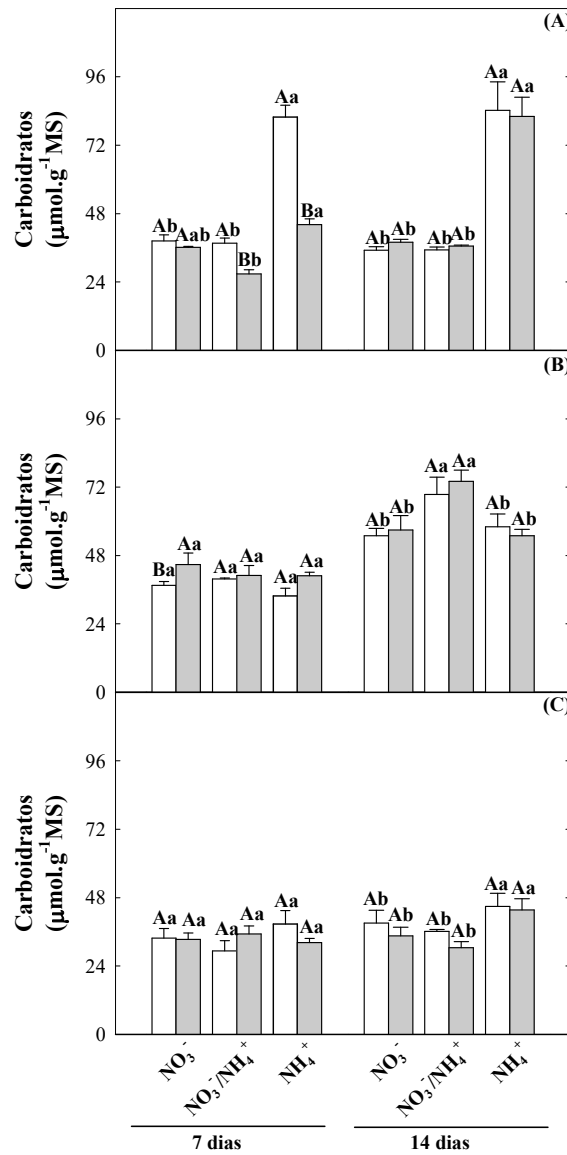
4.11 Teores de carboidratos solúveis

De modo geral, os teores de carboidratos solúveis foram pouco alterados pela salinidade, na maioria dos tempos e tratamentos (Figura 18). Nas folhas, aos 7 dias de estresse, a salinidade reduziu, de maneira mais pronunciada, os teores de carboidratos solúveis das plantas nutridas com NH_4^+ , sendo essa redução de 46%, em comparação ao controle (Figura 18A). Além disso, durante todo o período experimental, houve um maior acúmulo de carboidratos solúveis nas folhas das plantas nutridas com NH_4^+ em comparação às dos demais tratamentos de N, tanto em condições controle, quanto de salinidade (Figura 18A).

Nos caules, a salinidade aumentou os teores de carboidratos solúveis em 19%, apenas aos 7 dias, nas plantas nutridas com NO_3^- (Figura 18B). Aos 14 dias, houve nesse órgão um maior acúmulo de carboidratos solúveis nas plantas nutridas com a mistura NO_3^-/NH_4^+ , tanto em condições controle, quanto de estresse salino, em comparação aos outros tratamentos de N. Nas raízes, não houve efeito da salinidade sobre esses teores, contudo, as plantas nutridas com NH_4^+ , aos 14 dias, acumularam mais carboidratos solúveis, em comparação às demais fontes de N empregadas (Figura 18C). O acúmulo de carboidratos solúveis é uma importante estratégia para o aumento da tolerância das plantas à salinidade (CHEN *et al.*, 2007), contudo, neste estudo, esse estresse pouco influenciou os teores de

carboidratos solúveis, indicando, portanto, que esses compostos possuem provavelmente um papel secundário na resposta das plantas de girassol à salinidade.

Figura 18. Teores de carboidratos solúveis em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

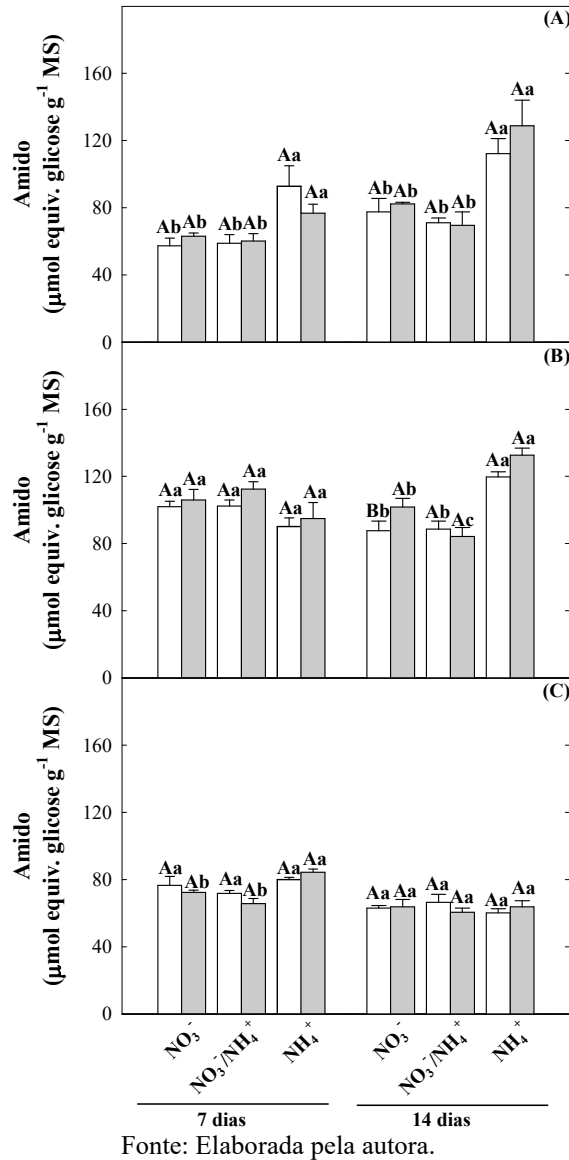
Neste trabalho, de maneira geral, foi encontrado que plantas nutridas com NH_4^+ acumularam mais carboidratos solúveis que as plantas nutridas com as outras fontes de N (Figura 18). Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente (BIALCZYC *et al.*, 2005; FEIJÃO, 2009; MIRANDA *et al.*, 2013). Plantas que crescem em meio com NH_4^+ precisam evitar o efeito tóxico desse íon; dessa forma, o NH_4^+ deve ser prontamente

assimilado em compostos orgânicos, um processo que requer um alto suprimento de carboidratos (LIPS *et al.*, 1990). Neste estudo, foram observados teores elevados de NH_4^+ livre e carboidratos nas plantas nutridas com esse íon, principalmente nas folhas (Figuras 13 e 18). Esses resultados sugerem que essas plantas induzem um maior acúmulo de carboidratos a fim de assimilar o NH_4^+ em excesso (BIALCZYK *et al.*, 2005; GUO, ZU; TANG, 2012). Contudo, a *A* e, conseqüentemente, a relação *A/Ci* foram reduzidas nessas plantas (Figura 3), portanto, como a assimilação de CO_2 foi menor, a maior alocação de esqueletos carbônicos para a assimilação do NH_4^+ em excesso pode ter resultado em prejuízo ao crescimento dessas plantas (Figuras 1 e 2). Esses estudos confirmam os resultados de outros autores, os quais mostraram que o *status* de carboidratos nas folhas está fortemente relacionado com a dinâmica de NH_4^+ (RUAN *et al.*, 2007; KANT *et al.*, 2007). Segundo Mahmood e Kaiser (2003), o crescimento de raízes na presença de NH_4^+ como única fonte de N foi prejudicado pelo maior acúmulo de carboidratos e compostos nitrogenados nas raízes dessas plantas. O efeito negativo do NH_4^+ no crescimento foi parcialmente revertido pela a adição de NO_3^- e/ou HCO_3^- no meio de crescimento (BIALCZYK *et al.*, 2005; SIDDIQI *et al.*, 2002). Em outros estudos, porém, a fonte de N não influenciou os conteúdos de carboidratos nas plantas (FRECHILLA *et al.*, 2001).

4.12 Teores de amido

Os teores de amido em folhas, caules e raízes de plantas de girassol estão apresentados na Figura 19. A salinidade praticamente não alterou esses teores durante todo o período experimental e nos diferentes órgãos analisados. Nas folhas, em concordância ao observado para os carboidratos solúveis, os maiores teores de amido foram verificados nas plantas nutridas com NH_4^+ , tanto em condições controle, como de salinidade, nos dois tempos analisados (Figura 19A). Contudo, nos caules, essa mesma resposta foi observada apenas aos 14 dias de estresse salino (Figura 19B); ainda nesse órgão, houve aumento de 16% nos teores de amido nas plantas estressadas e nutridas com NO_3^- , em comparação ao controle, aos 14 dias. Nas raízes, aos 7 dias de estresse, pôde-se destacar o maior acúmulo de amido em plantas estressadas e nutridas com NH_4^+ , em comparação às outras fontes de N estudadas e sob as mesmas condições (Figura 19C).

Figura 19. Teores de amido em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



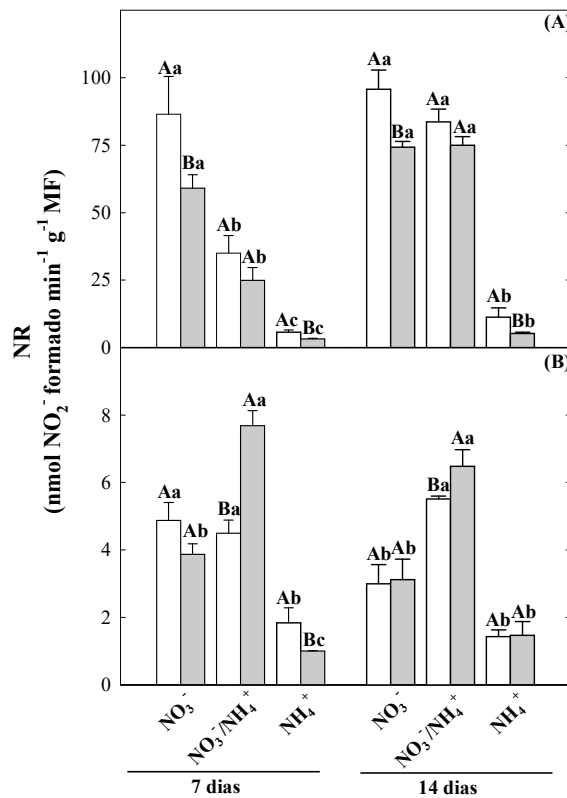
Fonte: Elaborada pela autora.

O acúmulo de amido foi maior nas plantas nutridas com NH₄⁺, sendo isso verificado principalmente na parte aérea (Figura 19). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de tomateiro e fumo (BIALCZYK *et al.*, 2005; WALCH-LIU *et al.*, 2000), contudo, em *Leptochloa fusca* e sorgo, o conteúdo de amido foi maior nas raízes das plantas nutridas com NH₄⁺, não havendo diferenças significativas nos conteúdos da parte aérea, em comparação com as plantas supridas com NO₃⁻ (MAHMOOD; KAISER, 2003; MIRANDA *et al.*, 2013).

4.13 Atividade das enzimas do metabolismo do N

O efeito da salinidade sobre a atividade da enzima redutase do nitrato (NR) foi dependente da fonte de N a que as plantas estiveram submetidas. De modo geral, a atividade da NR nas folhas das plantas de girassol reduziu à medida que a concentração de NO_3^- no meio de cultivo diminuiu; as plantas nutridas apenas com NH_4^+ , portanto, foram as que apresentaram a menor atividade da NR nesses órgãos, em ambos os tempos de estresse (Figura 20). Ainda nas folhas, a atividade da NR foi reduzida pela salinidade nas plantas nutridas com NO_3^- ou NH_4^+ , mas não houve qualquer efeito significativo desse estresse nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, em ambos os tempos de estresse (Figura 20A). Nas raízes, nos dois tempos analisados, a atividade da NR foi maior nas plantas nutridas com NO_3^- e especialmente com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, e nessas últimas a salinidade aumentou em 71% a atividade dessa enzima, aos 7 dias, e em 17%, aos 14 dias, em comparação aos respectivos controles.

Figura 20. Atividade da redutase do nitrato (NR) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

A NR é uma enzima-chave na regulação da assimilação de N (KAISER; HUBER, 1994). Neste estudo, a atividade dessa enzima foi maior nas folhas do que nas raízes, e isso já havia sido observado anteriormente em plantas de milho e girassol (FEIJÃO, 2009; SILVA, 2013), mas essa resposta não é regra geral, pois, em arroz e soja, as raízes foram os órgãos em que houve maior atividade da NR (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992; KATIYAR; DUBEY, 1992). A maior atividade da NR nas folhas de girassol, em relação às raízes, relacionou-se fortemente com o intenso transporte de NO_3^- via xilema, que dependeu da concentração desse íon na solução nutritiva (Figura 14). Além disso, houve uma menor concentração de NO_3^- nas folhas, em comparação aos demais órgãos, que demonstra provavelmente a maior assimilação desse íon (Figura 11). A assimilação do NO_3^- é energeticamente dispendiosa, por isso é mais vantajoso às plantas assimilar esse íon nas folhas, onde há alta concentração de açúcares e poder redutor advindos dos processos fotossintéticos (GLASS *et al.*, 2002).

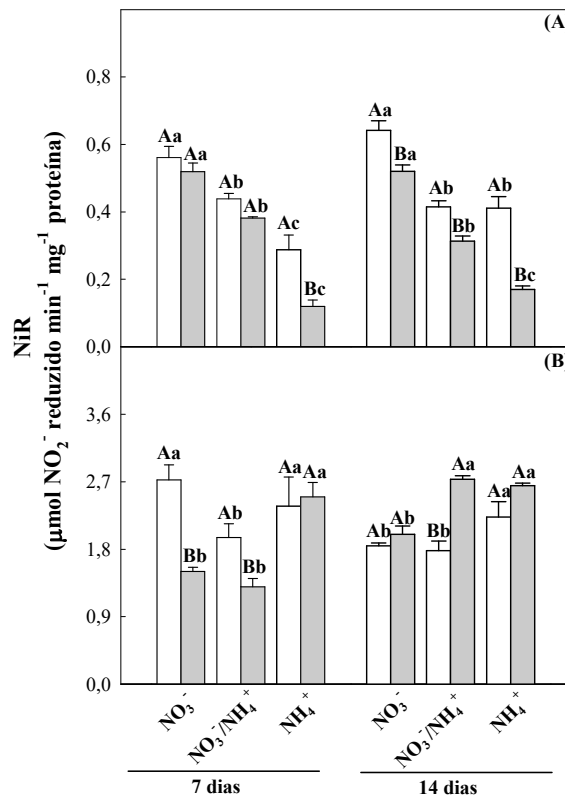
A salinidade reduziu a atividade da NR das folhas, contudo nas raízes foram observados aumentos nessa atividade com esse estresse. O efeito da salinidade sobre a atividade da NR é bastante controverso e depende da espécie estudada. O estresse salino pode provocar redução (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; DEBOUBA *et al.*, 2006a, b; NATHAWAT *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2001; SURABHI *et al.*, 2008), aumento (KATIYAR; DUBEY, 1992; TANG *et al.*, 2011) ou não alterar (ASLAM; HUFFAKER; RAINS, 1984) a atividade da NR. Em plantas de arroz, a atividade *in vivo* da NR foi aumentada pela salinidade marcadamente nas plantas tolerantes aos sais, enquanto que nas sensíveis houve redução nessa atividade. Esses autores concluíram que a tolerância à salinidade estaria associada com a maior atividade da NR e sua maior ativação sob salinização (KATIYAR; DUBEY, 1992). A redução na atividade da NR, encontrada em várias culturas submetidas à salinidade, é atribuída à inibição da absorção de NO_3^- pelo Cl^- , reduzindo a quantidade de substrato no sítio ativo da enzima (NATHAWAT *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2001).

Particularmente nas folhas, houve atividade elevada da NR nas plantas nutridas com NO_3^- , em ambos os tempos de coleta, e nas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, aos 14 dias. Isso está ligado à maior absorção de NO_3^- nessas plantas, já que esse íon induz a atividade da NR através da alteração na expressão de seus genes, aumentando a transcrição deles (EHLTING *et al.*, 2007; REDINBAUGH; CAMPBELL, 1991). De maneira similar, NO_3^- foi o principal regulador da expressão e da atividade da NR em plantas de milho (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000), ao passo que, em *Bruguiera paviiflora*, a salinidade reduziu a

atividade da NR, e isso foi acompanhado por um decréscimo nos teores de nitrato e de N-total nessas plantas (PARIDA; DAS, 2004).

A atividade da redutase do nitrito (NiR) nas folhas foi maior nas plantas nutridas com NO_3^- , em ambos os tempos de estresse. Aos 7 dias, a salinidade afetou a atividade dessa enzima apenas nas plantas nutridas com NH_4^+ , em que houve redução de 58% nessa atividade (Figura 21). Já aos 14 dias, a salinidade reduziu a atividade da NiR em todos os tratamentos de N, mas novamente as plantas nutridas com NH_4^+ foram as mais afetadas por esse estresse (redução de 58%, em relação ao controle). Nas raízes, aos 7 dias de estresse, a atividade da NiR foi significativamente reduzida pela salinidade nas plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, não havendo, portanto, qualquer efeito desse estresse nas plantas nutridas com NH_4^+ (Figura 21). Aos 14 dias, de modo geral, a atividade da NiR nas raízes foi maior nas plantas nutridas com NH_4^+ , e a salinidade aumentou essa atividade nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 21).

Figura 21. Atividade da redutase do nitrito (NiR) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nas folhas, de maneira semelhante ao observado para a atividade da NR, plantas nutridas com NO_3^- e com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ apresentaram as maiores atividades da NiR, tanto em condições controle, como de estresse salino, o que é coerente com o fato de a NR produzir o substrato para a atividade da NiR. Em plantas de tomate e mostarda, a atividade da NR como a da NiR foram maiores em plantas nutridas com NO_3^- do que naquelas nutridas com NH_4^+ (NASRAOUI-HAJAJIA *et al.*, 2011; NATHAWAT *et al.*, 2005). Isso sugere que a atividade da NR e da NiR é coordenada em folhas e que são reguladas pelo suprimento externo de NO_3^- (DEBOUBA *et al.*, 2006a).

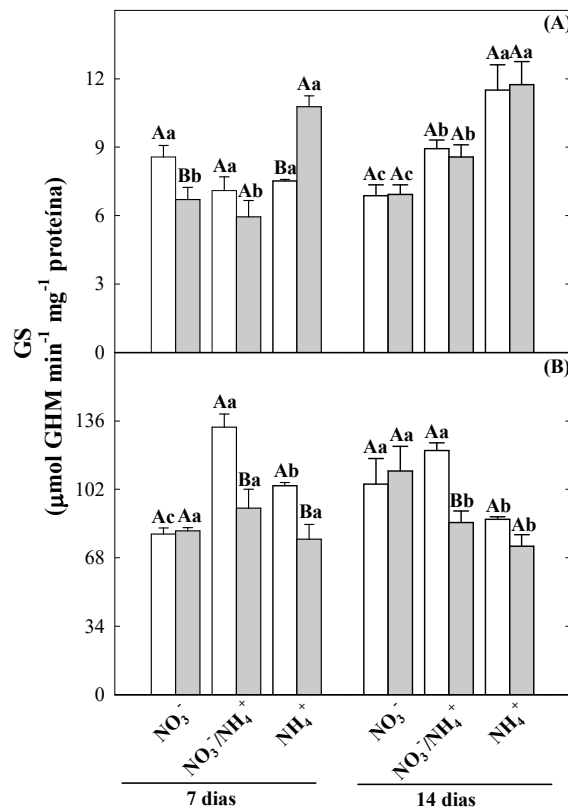
De maneira geral, a salinidade reduziu a atividade da NiR (Figura 21). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de soja, tomate, amoreira e ervilha (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992; DEBOUBA *et al.*, 2006a; DEBOUBA *et al.*, 2007; SHAHID *et al.*, 2011; SURABHI *et al.*, 2008), mas em plantas de arroz a atividade da NiR aumentou com a salinidade (KATIYAR; DUBEY, 1992).

Aos 7 dias de estresse, a atividade da sintetase da glutamina (GS) nas folhas variou pouco com a fonte de N, mas a salinidade, por sua vez, reduziu a atividade dessa enzima nas plantas nutridas com NO_3^- e a aumentou nas plantas nutridas com NH_4^+ , distinguindo-as daquelas nutridas com as demais fontes de N (Figura 22). Aos 14 dias, não houve efeito significativo da salinidade na atividade da GS em quaisquer das nutrições de N, e ela aumentou gradativamente à medida que a concentração de NH_4^+ no meio de cultivo foi maior (Figura 22). Já nas raízes, aos 7 dias, a atividade da GS foi maior nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, e a salinidade reduziu essa atividade em 30%, nessas mesmas plantas, e em 25%, naquelas nutridas com NH_4^+ (Figura 22). Aos 14 dias, a atividade da GS nas raízes variou pouco entre os tratamentos de N e foi afetada pela salinidade apenas nas plantas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 22).

O NH_4^+ produzido pela ação combinada das enzimas NR e NiR ou a partir de outras origens (solução do solo, fotorrespiração, degradação de proteínas) é incorporado em aminoácidos pela ação do sistema GS/GOGAT (sintetase da glutamina e sintase do glutamato). Em folhas de plantas nutridas com NH_4^+ , foi observada uma maior atividade da GS em comparação às demais fontes de N (CRUZ *et al.*, 2011; HORCHANI *et al.*, 2010; SHAN *et al.*, 2012), e esse fato é concordante com o maior acúmulo de N-aminossolúveis e de glutamina nas folhas destas plantas (Figura 15A e 16C). Esses dados sugerem que a GS nas folhas desempenha um importante papel na assimilação do NH_4^+ em excesso, contudo o nível de atividade da GS pareceu ser insuficiente para reduzir os teores de NH_4^+ nas folhas, não sendo eficiente, portanto, para a desintoxicação dessas plantas (Figura 13). Magalhães e

Huber (1991), trabalhando com plantas de arroz, também verificaram que a atividade da GS aumentou nitidamente na presença de NH_4^+ , porém isso foi acompanhado pela redução de NH_4^+ . Ademais, a atividade da GS foi maior nas raízes do que nas folhas, fato que provavelmente permitiu a maior assimilação de NH_4^+ nas raízes (HORCHANI *et al.*, 2010), contudo, em outros estudos, houve uma resposta contrária, indicando que isso varia com a espécie em questão (CRUZ *et al.*, 2011; SHAN *et al.*, 2012).

Figura 22. Atividade da sintetase da glutamina (GS) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



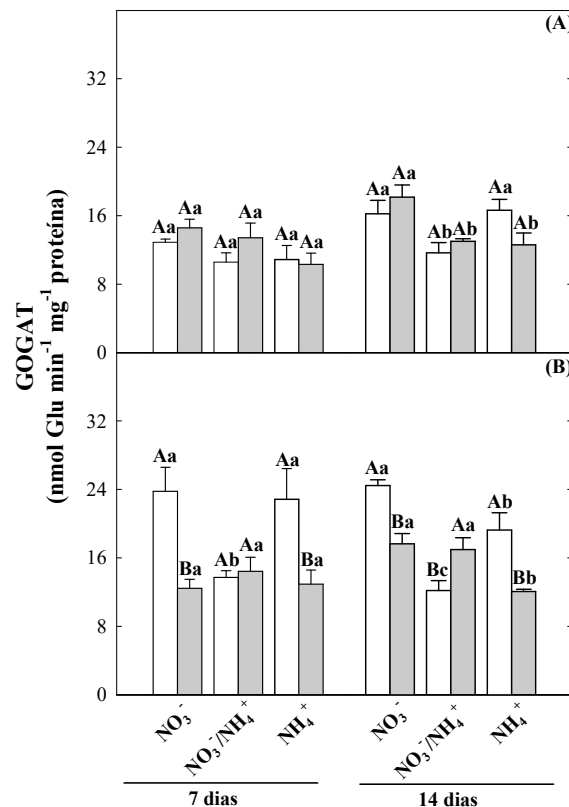
Fonte: Elaborada pela autora.

Com relação à salinidade, houve reduções da atividade da GS em razão desse estresse, particularmente nas raízes. Alguns autores também verificaram que a GS foi inibida pelo estresse salino (DEBOUBA *et al.*, 2006a; TANG *et al.*, 2011). Segundo Debouba (2006a), o estresse oxidativo gerado em condições de salinidade foi o responsável pela inibição da GS em plantas de tomate, através da oxidação dos resíduos de histidina da enzima por radicais hidroxil. Outra hipótese é que uma maior quantidade de glutamato é convertida em prolina e arginina para o ajustamento osmótico (ZHU, 2002; TANG *et al.*, 2011). Contudo, em várias espécies, houve aumento da atividade da GS em condições salinas

(HOSSAIN *et al.*, 2012; KANT *et al.*, 2007; PÉREZ-LOPEZ *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2003; SURABHI *et al.*, 2008). Esse aumento foi proposto com uma característica de tolerância à salinidade (HOSHIDA *et al.*, 2000; SAHU; SAHOO; SAHOO, 2001), devido a remoção do NH_4^+ extra gerado pelo aumento da fotorrespiração nestas condições. Ainda, a atividade da GS pode aumentar a produção de glutamato, um precursor para a síntese de prolina, contribuindo para o ajustamento osmótico (HOSSAIN *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2003; VEERANAGAMALLAIAH *et al.*, 2007).

Não foi observado efeito significativo da salinidade na atividade da sintase do glutamato (GOGAT) nas folhas das plantas de girassol, em ambos os tempos de estresse, e houve pouca variação nessa atividade em função da fonte de N (Figura 23). Nas raízes, aos 7 dias, a atividade da GOGAT foi maior nas plantas nutridas com NO_3^- ou com NH_4^+ , e essas plantas foram as mais afetadas pela salinidade, nas quais a atividade da GOGAT reduziu 45%, em média (Figura 23). Aos 14 dias, a atividade da GOGAT foi afetada pela salinidade em todos os tratamentos de N, tendo sido reduzida nas plantas nutridas com NO_3^- e com NH_4^+ , e aumentada, naquelas nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (Figura 23).

Figura 23. Atividade da sintase do glutamato (GOGAT) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) nutridas com diferentes fontes de N e submetidas a condições controle (colunas brancas) ou de estresse salino (colunas cinza) por 7 ou 14 dias. Letras maiúsculas iguais, em uma mesma fonte de N, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.



Fonte: Elaborada pela autora.

As diferentes fontes de N não afetaram significativamente a atividade da GOGAT nas plantas de girassol (Figura 23), e essa resposta também foi observada por outros autores em plantas de cevada (KANT *et al.*, 2007) e tomateiro (GHANEM *et al.*, 2011). De acordo com Kant *et al.* (2007), isso pode causar um aumento no *pool* de glutamina, levando a um *feedback* negativo na expressão das enzimas envolvidas na assimilação do N. Contudo, neste estudo, não foi observado qualquer *feedback* negativo na atividade da GS (Figura 22). Por outro lado, neste estudo, houve uma maior quantidade de glutamina nas folhas de plantas nutridas com NH_4^+ , seguidas das nutridas com a mistura $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, que esteve em acordo com a atividade da GS, ao passo que os teores de glutamato foram pouco influenciados pela fonte de N, assim como a atividade da GOGAT (Figuras 16A, 16C, 22 e 23). Trabalhos anteriores mostraram que a atividade da GS pode favorecer a síntese de glutamina, prolina e outros solutos orgânicos característicos do ajustamento osmótico sob condições de estresse (HOSSAIN *et al.*, 2012; KANT *et al.*, 2007; LORENZO; SILVERIO; CABALLERO, 2001).

A salinidade, de maneira geral, reduziu a atividade da GOGAT nas raízes (Figura 23). Reduções causadas pela salinidade também foram encontradas por outros autores (DEBOUBA *et al.*, 2006a; GHANEM *et al.*, 2011). Embora o sistema GS/GOGAT trabalhe de forma coordenada, no presente estudo não se observou uma relação estreita entre as variações na atividade dessas enzimas frente à salinidade. Ghanem *et al.* (2011) encontrou um aumento da GS e nenhum efeito na GOGAT em resposta à salinidade em folhas de tomate.

5 CONCLUSÕES

1. A nutrição combinada de N ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) foi a mais eficiente em reduzir os efeitos deletérios da salinidade em plantas de girassol, por promover maior crescimento, melhor relação iônica e uma utilização mais eficiente do N em condições de estresse;
2. As plantas de girassol desenvolveram sintomas de toxidez ao NH_4^+ ;
3. O acúmulo elevado de compostos nitrogenados nas plantas nutridas com NH_4^+ não contribuiu eficientemente para a desintoxicação delas, frente a esse íon;
4. A presença de íons NO_3^- na solução nutritiva influenciou positivamente a atividade da redutase do nitrato e redutase do nitrito em folhas de plantas de girassol.

REFERÊNCIAS

- ABD-EL BAKI, G.K.; SIEFRITZ, F.; MAN, H.M.; WEINER, H.; KALDENHOFF, R.; KAISER, W.M. Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 515-521, 2000.
- ALI, S.; FAROOQ, M.A.; JAHANGIR, M.M.; ABBAS, F.; BHARWANA, S.A.; ZHANG, G.P. Effect of chromium and nitrogen form on photosynthesis and anti-oxidative system in barley. **Biologia Plantarum**, v. 57, p. 758-763, 2013.
- AL-MUTAWA, M.M.; EL-KATONY, T.M. Salt tolerance of two wheat genotypes in response to the form of nitrogen. **Agronomie**, v. 21, p. 259-266, 2001.
- ALVAREZ-PIZARRO, J.C.; GOMES-FILHO, E.; LACERDA, C.F.; ALENCAR, N.L.M.; PRISCO, J.T. Salt-induced changes on H⁺-ATPase activity, sterol and phospholipid content and lipid peroxidation of root plasma membrane from dwarf-cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.59, p.125-135, 2009.
- AMONKAR D.V.; KARMARKAR S.M. Nitrogen uptake and assimilation in halophytes. In: SRIVASTAVA, H.S.; SINGH, R.P. (Ed.) **Nitrogen Nutrition in Higher Plants**. New Delhi: Associated Publisher Co., 1995. p. 431-445
- ANDREWS, M.; LEA, P.J.; RAVEN, J.A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Annals of Applied Biology**, 145, 25-40, 2004.
- ANDREWS, M.; RAVEN, J.A.; LEA, P.J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, v. 163, p. 174-199, 2013.
- AQUINO, A.J.S.; LACERDA, C.F.; BEZERRA, M.A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, R.N.T. Crescimento, partição de matéria seca e retenção de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em dois genótipos de sorgo irrigados com águas salinas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.961-971, 2007.
- ARAGÃO, R.M.; SILVEIRA, J.A.G.; SILVA, E.N.; LOBO, A.K.M.; DUTRA, A.T.B. Absorção, fluxo no xilema e assimilação do nitrato em feijão-caupi submetido à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, p.100-106, 2010.
- ARAGÃO, R.M.; SILVA, E.N.; VIEIRA, C.F.; SILVEIRA, J.A.G. High supply of NO₃⁻ mitigates salinity effects through an enhancement in the efficiency of photosystem II and CO₂ assimilation in *Jatropha curcas* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 2135-2143, 2012.
- ARMSTRONG W. Waterlogged soils. In: ETHERINGTON, J.R. (Ed.) **Environment and plant ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1982. p. 290-330.
- ASHRAF, M. Breeding for salinity tolerance in plants. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 17-42, 1994.

ASHRAF, M. Interactive effect of salt (NaCl) and nitrogen form on growth, water relations and photosynthetic capacity of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Annals of Applied Biology**, v. 135, p. 509-513, 1999.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.

ASHRAF, M.; SULTANA, R. Combination effect of NaCl salinity and nitrogen form on mineral composition of sunflower plants. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 615-619, 2000.

ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C.; RAINS, D.W. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. **Plant Physiology**, v. 76, p. 321-325, 1984.

AZEVEDO NETO, A.D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T. Salinity and oxidative Stress. In: Nafees A. Khan, Sarvajeet Singh. (Org.). **Abiotic Stress and Plant Responses**. 1 ed. New Delhi: IK International, 2008, p. 58-82.

AZEVEDO NETO, A.D.; PEREIRA, P.P.A.; COSTA, D.P.; SANTOS, A.C.C. Fluorescência da clorofila como uma ferramenta possível para seleção de tolerância à salinidade em girassol. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 893-897, 2011.

AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C.F.; SILVA, J.V.; COSTA, P.H.A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Changes in soluble amino-N, soluble proteins and free amino acids in leaves and roots of salt-stressed maize genotypes. **Journal of Plant Interactions**, v.4, p.137-144, 2009.

BAETHGEN, W.E.; ALLEY, M.M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, p. 961-969, 1989.

BALKOS, K.D.; BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Optimization of ammonium acquisition and metabolism by potassium in rice (*Oryza sativa* L. cv. IR-72). **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 23-34, 2010.

BARHOUMI, Z.; ATIA, A.; RABHI, M.; DJEBALL, W.; ABDELLY, C.; SMAOUI, A. Nitrogen and NaCl salinity effects on the growth and nutrient acquisition of the grasses *Aeluropus littoralis*, *Catapodium rigidum*, and *Brachypodium distachyum*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.173, p.149-157, 2010.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, J. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BEGGS, C.J.; KUHN, K.; BÖCKER, R.; WELLMANN, E. Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. **Planta**, v. 172, p. 121-126, 1987.

- BELOW, F.E. Nitrogen metabolism and crop productivity. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of Plant and Crop Physiology**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 275-301.
- BENDIXEN, R.; GERENDÁS, J.; SCHINNER, K.; SATTELMACHER, B.; HANSEN, U.P. Difference in zeaxanthin formation in nitrate- and ammonium-grown *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 255-261, 2001.
- BIALCZYK, J.; LECHOWSKI, Z.; DZIGA, D.; MOLENDKA, K. Carbohydrate and free amino acid contents in tomato plants grown in media with bicarbonate and nitrate or ammonium. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, p. 523-529, 2005.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278-293, 1966.
- BISCARO, G.A.; MACHADO, J.R.; TOSTA, M.S.; MENDONÇA, V.; SORATTO, R.P.; CARVALHO, L.A. Adubação nitrogenada em cobertura no girassol irrigado nas condições de Cassilândia-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1366-1373, 2008.
- BLAMEY, F.P.C.; ZOLLINGER, R.K.; SEITER, A.A. Sunflower production and culture. In: SEITEER, A.A. (Ed.). **Sunflower technology and production**. Madison: American Society of Agronomy, p.595-670. 1997.
- BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1099-1111, 1995.
- BOTELLA, M.A.; CERDA, A.; LIPS, S.H. Kinetics of NO_3^- and NH_4^+ uptake by wheat seedlings: effect of salinity and nitrogen source. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 53-57, 1994.
- BOTELLA, M.A.; MARTINEZ, V.; NIEVES, M.; CERDÁ, A. Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, p. 793-804, 1997.
- BOTELLA M.; ROSADO, A.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Plant adaptive responses to salinity stress. In: JENKS, M.A.; HASEGAWA, P.M. (ed.). **Plant abiotic stress**. New York: Blackwell Publishing, p. 37-70, 2005.
- BOURGEAIS-CHAILLOU, P.; PEREZ-ALFOCEA, F., GUERRIER, G. Comparatives effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1225-1233, 1992.
- BOWSER, C.G.; LACEY, A.E.; HANKE, G.T.; CLARKSON, D.T.; SAKER, L.R.; STULEN, I.; EMES, M.J. The effect of G1c6P uptake and its subsequent oxidation within pea root plastids on nitrite reduction and glutamate synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1109–1118, 2007.
- 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. 246-254, 1976.

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

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER H.J. Plant nitrogen transport and its regulation in changing soil environments. **Journal of Crop Improvement**, v. 15, p. 1-23, 2005.

BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 4255-4258, 2001.

BRIX, H.; DYHR-JENSEN, K.; LORENZEN, B. Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L. growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2441-2450, 2002.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAMANES, G.; CERESO, M.; PRIMO-MILLO, E.; GOJON, A.; GARCIA-AGUSTIN, P. Ammonium transport and CitAMT1 expression are regulated by light and sucrose in *Citrus* plants. **The Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2811-2825, 2007.

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

CAMPOS, M.S.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, F.R.A.; SILVA, R.C.P.; CÂNDIDO, W.S. Efeito da salinidade e fontes de nitrogênio na matéria seca do girassol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, p. 165-171, 2010.

CARVALHO, F.E.L.; LOBO, A.K.M.; BONIFACIO, A.; MARTINS, M.O.; LIMA NETO, M.C.; SILVEIRA, J.A.G. Aclimação ao estresse salino em plantas de arroz induzida pelo pré-tratamento com H_2O_2 . **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 416-423, 2011.

CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A.; LEITE, R.M.V.B.C.; KARAM, D.; MELLO, H.C.; GUEDES, L.C.A.; FARIAS, J.R.B. **A cultura do girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, p. 827-833, 1997.

CASTRO, C.; FARIAS, J.R.B. Ecofisiologia do girassol. In. LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.A.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. 1.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 163-218.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CERESO, M.; FLORS, V.; LEGAZ, F.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Characterization of the low affinity transport system for NO_3^- uptake by *Citrus* roots. **Plant Science**, v. 160, p. 95-104, 2000.

CHEN, Z.; CUIN, T.A.; ZHOU, M.T.; WOMEY, A.; NAIDU, B.P.; SHABALA, S. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 4245-4255, 2007.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. -K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437-448, 2005.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: Grãos, safra 2012/2013**, nono levantamento, Junho 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2013.

CORUZZI, G.; LAST, R. Amino acids. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, E. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 358-410.

CRAMER, G.R.; LÄUCHLI, A.; POLITO, V.S. Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? **Plant Physiology**, v. 79, p. 207-211, 1985.

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

CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**. v. 3, p. 389-395, 1998.

CRUZ, C.; DOMÍNGUEZ-VALDIVIA, M.D.; APARICIO-TEJO, P.M.; LAMSFUS, C.; BIO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A.; MORAN, J.F. Intra-specific variation in pea responses to ammonium nutrition leads to different degrees of tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, p. 233-243, 2011.

D'APUZZO, E.; ROGATO, A.; SIMON-ROSIN, U.; EL ALAOU, H.; BARBULOVA, A.; BETTI, M.; DIMOU, M.; KATINAKIS, P.; MARQUEZ, A.; MARINI, A.M.; UDVARDI, M.K.; CHIURAZZI, M. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1763-1774, 2004.

DARCANSOY İŞERİ, Ö.; AKSOY KÖRPE, D.; SAHIN, F.I.; HABERAL, M. High salt induced oxidative damage and antioxidant response differs in *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. cultivars. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 7, p. 15-22, 2013.

DATTA, R.; SHARMA, R. Temporal and spatial regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in greening maize leaves. **Plant Science**, v. 144, p. 77-83, 1999.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 55-76, 1991.

DEBOUBA, M.; GOUIA, H.; VALADIER, M.-H, GHORBEL, M.H.; SUZUKI, A. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings

grown under high or low nitrate medium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 409-419, 2006a.

DEBOUBA, M.; GOUIA, H.; SUZUKI, A.; GHORBEL, M.H. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1247-1258, 2006b.

DEBOUBA, M.; MAÂROUFI-DGHIMI, H.; SUZUKI, A.; GHORBEL, M.H.; GOUIA, H. Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. **Annals of Botany**, v. 99, p. 1143-1151, 2007.

DING, X.; TIAN, C.; ZHANG, S.; SONG, J.; ZHANG, F.; MI, G.; FENG, G. Effects of NO₃⁻-N on the growth and salinity tolerance of *Tamarix laxa* Willd. **Plant and Soil**, v.331, p.57-67, 2010.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, 1085-1097, 1995.

DKHIL, B.B.; DENDEN, M. Effect of salt stress on growth, anthocyanins, membrane permeability and chlorophyll fluorescence of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings. **American Journal of Plant Physiology**, v. 7, p. 174-183, 2012.

DLUZNIEWSKA, P.; GESSLER, A.; DIETRICH, H.; SCHNITZLER, J.P.; TEUBER, M.; RENNENBERG, H. Nitrogen uptake and metabolism in *Populus x canescens* as affected by salinity. **New Phytologist**, v. 173, p. 279-293, 2007.

DUAN, Y. H.; ZHANG, Y. L.; YE, L. T.; FAN, X. R.; XU, G. H.; SHEN, Q. R. Response of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. **Annals of Botany**, v. 99, p. 1153-1160, 2007.

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

EHLTING, B.; DLUZNIEWSKA, P.; DIETRICH, H.; SELLE, A.; TEUBER, M.; HÄNSCH, R.; NEHLS, U.; POLLE, A.; SCHNITZLER, J.P.; RENNENBERG, H.; GESSLER, A. Interaction of nitrogen nutrition and salinity in Grey poplar (*Populus tremula x alba*). **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 796-811, 2007.

ERYLMAZ, F. The relationship between salt stress and anthocyanin content in higher plants. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 20, p. 47-52, 2006.

FAGERIA, N.K.; GHEYI, H.R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: GHEYI, H.R., QUEIROZ, J.E., MEDEIROS, J.F. (Ed.). **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB, 1997. p. 363-383.

FAGUNDES, J.D.; SANTIAGO, G.; MELLO, A.M.; BELLÉ, R.A.; STRECK, N.A. Crescimento, desenvolvimento e retardamento da senescência foliar em girassol de vaso (*Helianthus annuus* L.): fontes e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, v. 37, p. 987-993, 2007.

FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Rome: FAO Land and Plant Nutrition Management Service, 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush>

FAO, Food and agriculture organization of the united nations. 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>

FARIAS, J.R.B.; ALMEIDA, I.R.; BUCHE, M.V.; CASTRO, C.de; SILVA, F.A.M.de. Caracterização da aptidão climática de regiões para o cultivo do girassol. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SARAIVA, O.F. (Org.). Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2001: girassol e trigo. Londrina: Embrapa Soja, p. 19-21, 2002.

FAURE, J.D.; VINCENTZ, M.; KRONENEGER, J.; CABOCHE, C. Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. **The Plant Journal**, v. 1, p. 107-113, 1991.

FEIJÃO, A.R. **Crescimento, trocas gasosas, partição de íons e metabolismo do nitrogênio em plantas de milho submetidas à salinidade e diferentes fontes de N.** 2009, 112 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FEIJÃO, A.R.; MARQUES, E.C; SILVA, J.C.B.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Nitrate modula os teores de cloreto e compostos nitrogenados em plantas de milho submetidas à salinidade. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p.10-19, 2013.

FERNÁNDEZ-CRESPO; CAMAÑES, G.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Ammonium enhances resistance to salinity stress in citrus plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1183-1191, 2012.

FERREIRA, R.G.; TÁVORA, F.J.A.F.; FERREYRA, F.F. Distribuição da matéria seca e composição química das raízes, caule e folhas de goiabeira submetidas a estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 79-88, 2001.

FIGUEIRA, E.M.A.P.; CALDEIRA, G.C.N. Effect of nitrogen nutrition on salt tolerance of *Pisum sativum* during vegetative growth. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 359-363, 2005.

FINNEMANN, J.; SCHJOERRING, J. Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. **The Plant Journal**, v. 24, p.171-181, 2000.

FLORES, P.; CARVAJAL, M.; CERDA, A.; MARTINEZ, V. Salinity and ammonium/nitrate interactions on tomato plant development, nutrition and metabolites. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p.1561-1573, 2001.

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

FORDE, B.G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 203-224, 2002.

FOYER, C.H.; PARRY, M.; NOCTOR, G. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 585-593, 2003.

FRECHILLA, S.; LASA, B.; IBARRETXE, L.; LAMSFUS, C.; APARICIO-TEJO, P. Pea responses to saline stress is affected by the source of nitrogen nutrition (ammonium or nitrate). **Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 171-179, 2001.

GAINES, T.P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G.J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371-374, 1984.

GARNICA, M.; HOUDUSSE, F.; YVIN, J. C.; GARCIA-MINA, J. M. Nitrate supply induces changes in polyamine content and ethylene production in wheat plants grown with ammonium. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p. 363-374, 2009.

GARNICA, M.; HOUDUSSE, F.; ZAMARREÑO A.M.; GARCIA-MINA, J.M. Nitrate modifies the assimilation pattern of ammonium and urea in wheat seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90, 357–369, 2010.

GAZOLLA, A.; FERREIRA JUNIOR, C. T.G.; CUNHA, D. A.; BORTOLINI, E. PAIAO, G. D.; PRIMIANO, I. V.; PESTANA, J.; D`ANDREÁ, M. S. C.; OLIVEIRA, M. S. **A cultura do girassol** (Apostila), Universidade de São Paulo, ESALQ. Piracicaba, 69 p., 2012.

GAZZARINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W.B. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. **The Plant Cell**, v. 11, p. 937–947, 1999.

GERENDÁS, J.; ZHU, Z.; BENDIXEN, R.; RATCLIFFE, R. G.; SATTELMACHER, B. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 160, p. 239–251, 1997.

GHANEM, M.E.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; ALBACETE, A.; POSPÍŠILOVÁ, H.; DODD, I.C.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; LUTTS, S. Nitrogen form alters hormonal balance in salt-treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 144-157, 2011.

GIVAN, V.C. Metabolic detoxication 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. 855-864, 2002.

GRATTAN, S.R.; GRIEVE, C.M. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, 1994, p. 203-226.

GRATTAN, S.R.; GRIEVE, C.M. Salinity-mineral nutrient relation in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 127-157, 1999.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

GRIFFIN, K.L.; WINNER, W.E.; STRAIN, B.R. Growth and dry matter partitioning in loblolly and ponderosa pine seedlings in response to carbon and nitrogen availability. **New Phytologist**, v. 129, p. 547-556, 1995.

GUIMARÃES, F.V.A.; LACERDA, C.F.; MARQUES, E.C.; ABREU, C.E.B.; AQUINO, B.F.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Supplemental Ca^{2+} does not improve growth but affects nutrient uptake in NaCl-stressed cowpea plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 9-18, 2012.

GUO, S.; CHEN, G.; ZHOU, Y.; SHEN, Q. Ammonium nutrition increases photosynthesis rate under water stress at early development stage of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 296, p. 115-124, 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.

HASEGAWA, P.M. Sodium (Na^+) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 19-31, 2013.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. -K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HAWKINS, H.J.; LEWIS, A.M. Effect of NaCl salinity, nitrogen form, calcium and potassium concentration on nitrogen uptake and kinetics in *Triticum aestivum* L. cv. Gamtoos. **New Phytologist**, v. 124, p. 171-177, 1993.

HERNANDEZ, J. A.; ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, v.115, p.251-257, 2002.

HESSINI, K.; HAMED, K.B.; GANDOUR, M.; MEJRI, M.; ABDELLEY, C.; CRUZ, C. Ammonium nutrition in the halophyte *Spartina alterniflora* under salt stress: evidence for a priming effect of ammonium? **Plant and Soil**, v. 370, p. 163-173, 2013.

HODGE, J.E.; HOFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (Ed.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v.1, p.380-394.

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 Ciência 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.

HOSHIDA, H.; TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A.; TAKADE, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 103–111, 2000.

HOSSAIN, M.A.; UDDIN, M.K.; ISMAIL, M.R.; ASHRAFUZZAMAN, M. Responses of glutamine synthetase-glutamate synthase cycle enzymes in tomato leaves under salinity stress. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, p. 509-515, 2012.

IRELAND, R.J.; LEA, P.J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In: SINGH, B.K. (Ed.). **Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 49-109.

IRSHAD, M.; ENEJI, A.E.; YASUDA, H. Comparative effect of nitrogen source on maize under saline and non-saline conditions. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 256-261, 2008.

IRSHAD, M.; HONNA, T.; ENEJI, A.E.; YAMAMOTO, S. Wheat response to nitrogen source under saline conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, p. 2603-2612, 2002.

JABEEN, N.; AHMAD, R. The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1699–1705, 2013.

KAISER, W.M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation in vivo by CO₂ availability. **Plant Physiology**, v. 96, p. 363–367, 1991.

KAISER, W.M.; FÖRSTER, J. Low CO₂ prevents nitrate reduction in leaves. **Plant Physiology**, v. 91, p. 970–974, 1989.

KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, v. 106, p. 817-821, 1994.

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

KANT, S.; KANT, P.; LIPS, H.; BARAK, S. Partial substitution of NO₃⁻ by NH₄⁺ fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 303-311, 2007.

KARRAY-BOURAOUI, N.; ATTIA, H.; MAGHZAOU, M.; MSILINI, N.; RABHI, M.; LACHAÛL, M. Physiological responses of *Arabidopsis thaliana* to the interaction of iron deficiency and nitrogen form. **Acta Biologica Hungarica**, v. 61, p. 204-213, 2010.

KATERJI, N.; HOORN, J.W.; HAMDY, A.; MASTRORILLI, M. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. **Agricultural Water Management**, v. 43, p. 99–109, 2000.

KATIYAR, S.; DUBEY, R.S. Influence of NaCl salinity on behaviours of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings differing in salt tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 169, p. 289-297, 1992.

KOHLER, B.; RASCHKE, K. The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. **Plant Physiology**, v. 122, p. 243-254, 2000.

KOHLER, B.; WEGNER, L.H.; OSIPOV, V.; RASCHKE, K. Loading of nitrate into the xylem: apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem parenchyma cells of barley roots. **The Plant Journal**, v. 30, p. 133-142, 2002.

KRAISER, T.; GRAS, D.E.; GUTIÉRREZ, A.G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R.A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1455-1466, 2011.

KUMAR, A.; SILIM, S.N.; OKAMOTO, M.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D. Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH_4^+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies *indica*. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 907-914, 2003.

LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; RUIZ, H.A. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 270-284, 2001.

LAUTER, F.R.; NINNEMANN, O.; BUCHER, M.; RIESMEIER, J.W.; FROMMER, W.B. Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p. 8139-8144, 1996.

LEA, P. J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. (Ed.). **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, 1999. 312 p.

LEITE, R.M.V.B.C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 641p.

LEWIS, O.A.M. **Plants and Nitrogen**. London: Edward Arnold Publishers, 1986. 104 p.

LI, G.; DONG, G.; LI, B.; LI, Q.; KRONZUCKER, H.J.; SHI, W. Isolation and characterization of a novel ammonium overly sensitive mutant, *amos2*, in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 235, p. 239-252, 2012.

LIPS, S.H.; LEIDI, E.O.; SILBERBUSH, M; SOARES, M.I.M; LEWIS, E.M. Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. **Journal of Plant Nutrition**, v. 13, p. 1271-1289, 1990.

LIU, J.; BAI, B; ZHAO, S.; SHI, D. Comparison of the effects of salt stress and salt-alkaline mixed stress on the mineral nutrition of sunflower. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, p. 1963-1975, 2012.

LORENZO, H.; SIVERIO, J.M.; CABALLERO, M. Salinity and nitrogen fertilization and nitrogen metabolism in rose plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 137, p. 77-84, 2001.

LUDEWIG, U.; VON WIRÉN, N.; RENTSCH, D.; FROMMER, W.B. Rhesus factors and ammonium: a function in efflux? **Genome Biology**, v. 2, reviews 1010.1-1010.5, 2001.

LUDEWIG, U.; WILKEN, S.; WU, B.; JOST, W.; OBRDLIK, P.; EL BAKKOURY, M.; MARINI, A.M.; ANDRE, B.; HAMACHER, T.; BOLES, E.; VON WIREN, N.; FROMMER, W.B. (2003) Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH₄ uniporters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 45603-45610, 2003.

MA, H. C.; FUNG, L.; WANG, S. S.; ALTMAN, A.; HÜTTERMANN, A. Photosynthetic response of *Populus euphratica* to salt stress. **Florest Ecology and Management**, v. 93, p. 55-61, 1997.

MÄCK, G.; TISCHNER, R. Constitutive and inducible net NH₄⁺ uptake of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 351-357, 1994.

MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M. Response of ammonium assimilation enzymes to nitrogen form treatments in different plant species. **Journal of Plant Nutrition**, v. 14, p. 175-185, 1991.

MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M.; TSAI, C.Y. Influence of the form of nitrogen on ammonium, amino acids and n-assimilating enzyme activity in maize genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, v. 18, p. 747-763, 1995.

MAHMOOD, T.; KAISER, W.M. Growth and solute composition of the salt-tolerant kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth] as affected by nitrogen source. **Plant and Soil**, v. 252, p. 359-366, 2003.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989. 201 p.

MANSOUR, M.M.F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v.43, p. 491-500, 2000.

MANSOUR, M.M.F.; SALAMA, K.H.A. Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 113-122, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1141-1157, 2010.

MATRASZEK, R. Nitrate reductase activity of two leafy vegetables as affected by nickel and different nitrogen forms. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 30, p. 361-370, 2008.

MENGEL, K; KIRKBY, E.A. **Principles of Plant Nutrition**. 4. ed. Bern: International Potash Institute, 1987. 687 p.

MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v. 274, p. 1-36, 2004.

MIRANDA, R.S.; ALVAREZ-PIZARRO, J.C.; ARAÚJO, C.M.S.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Influence of inorganic nitrogen sources on K^+/Na^+ homeostasis and salt tolerance in sorghum plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 841-852, 2013.

MOKHELE, B.; ZHAN, X.; YANG, G.; ZHANG, X. Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 92, p. 399-405, 2012.

M'RAH, S.; OUERGHI, Z.; BERTHOMIEU, C.; HAVAUX, M.; JUNGAS, C.; HAJJI, M.; GRIGNON, C.; LACHAÂL, M. Effects of NaCl on the growth, ion accumulation and photosynthetic parameters of *Thellungiella halophila*. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1022-1031, 2006

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 239-250, 2002.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 143-160, 1986.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.651-681, 2008.

MURRAY, J.R.; HACKETT, W.P. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. **Plant Physiology**, v. 97, p. 343-351, 1991.

NACRY, F.; BOUGUYON, E.; GOJON, A. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. **Plant and Soil**, v. 370, p.1-29, 2013.

NAGATA, T.; TODORIKI, S.; MASUMIZU, T.; SUDA, I.; FURUTA, S.; DU, Z.; KIKUCHI, S. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in Arabidopsis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 2992-2999, 2003.

NASRAOUI-HAJAJI, A.; CHAFFEI-HAOUARI, C.; GHORBELA, M.H.; GOUIA, H. Growth and nitrate assimilation in tomato (*Solanum lycopersicon*) grown with different nitrogen source and treated with cadmium. **Acta Botanica Gallica**, v. 158, p. 3-11, 2011.

NATHAWAT, N.S.; KUHAD, M.S.; GOSWAMI, C.L.; PATEL, A.L.; KUMAR, R. Nitrogen-metabolizing enzymes: effect of nitrogen sources and saline irrigation. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, p. 1089-1101, 2005.

NEMAT-ALLA, M.M.; BADAWI, A.M.; HASSAN, N.M.; EL-BASTAWISY, Z.M.; BADRAN, E.G. Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 8-18, 2008.

NGUYEN, H.T.T.; SHIM, I.S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Regulation of ammonium accumulation during salt stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Plant Production Science**, v. 8, p. 397-404, 2005.

NIU, X.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; PARDO, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.

NIU, Y.; CHAI, R.; DONG, H.; WANG, H.; TANG, C.; ZHANG, Y. Effect of elevated CO₂ on phosphorus nutrition of phosphate deficient *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh under different nitrogen forms. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 355-367, 2012.

NOBRE, R.G.; GHEYI, H.R.; SOARES, F.A.L.; CARDOSO, J.A.F. Produção de girassol sob estresse salino e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 929-937, 2011.

NUSSAUME, L.; VINCENTZ, M.; MEYER, C.; BOUTIN, J. P.; CABOCHE, M. Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. **The Plant Cell**, v. 7, p. 611-621, 1995.

OKAMOTO, M.; VIDMAR, J.J.; GLASS, A.D. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 304-317, 2003.

ORSEL, M.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F. Analysis of the *NRT2* nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. **Plant Physiology**, v. 129, p. 886-896, 2002.

ORT, D. When there is too much light. **Plant Physiology**, v. 125, p. 29-32, 2001.

OWEN, A.G.; JONES, D.L. Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 651-677, 2001.

PANDA, S.K.; UPADHYAY, R.K.; UPADHYAYA, H. Salinity stress induced physiological and biochemical changes in *Azolla pinnata*. **Acta Botanica Hungarica**, v. 48, n. 3-4, p. 369-380, 2006.

PARANYCHIANAKIS, N.V.; CHARTZOULAKIS, K.S. Irrigation of mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 106, p. 171-187, 2005.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 921-928, 2004.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. **Photosynthetica**, v. 41, p. 191-200, 2003.

PATRICK, M.L.; BRADLEY, T.J. The physiology of salinity tolerance in larvae of two species of *Culex mosquitoes*: The role of compatible solutes. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 821–830, 2000.

PÉREZ-LOPEZ, U.; ROBREDO, A.; MIRANDA-APODACA, J.; LACUESTA, M.; MUÑOZ-RUEDA, A.; MENA-PETITE, A. Carbon dioxide enrichment moderates salinity-induced effects on nitrogen acquisition and assimilation and their impact on growth in barley plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, p. 148– 158, 2013.

PEUKE, A.D.; JESCHKE, W.D.; HARTUNG, W. Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. II. The flows of cations, chloride and abscisic acid. **New Phytologist**, v. 140, p. 625-636, 1998.

PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (Org.). **Manejo da salinidade na agricultura irrigada: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 143-160.

PORTO, W.S.; CARVALHO, C.G.P.; PINTO, R.J.B. Adaptabilidade e estabilidade como critérios para seleção de genótipos de girassol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 491-499, 2007.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 767-773, 1999.

REDDY, B. R.; APTE, S. K.; THOMAS, J. Enhancement of cyanobacterial salt tolerance by combined nitrogen. **Plant Physiology**, v. 89, p. 204–210, 1989.

REDINBAUGH, M.; CAMPBELL, W. Higher plant responses to environmental nitrate. **Physiologia Plantarum**, v. 82, p. 640-650, 1991.

REMMLER, J.L.; CAMPBELL, W.H. Regulation of corn leaf nitrate reductase: synthesis and turnover of the enzyme's activity and protein. **Plant Physiology**, v. 80, p. 442-447, 1985.

RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. **Planta**, v. 125, p. 201-211, 1975.

RINNE, K.T.; SAURER, M.; STREIT, K.; SIEGWOLF, R.T.W. Evaluation of a liquid chromatography method for compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analysis of plant carbohydrates in alkaline media. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 2173-2185, 2012.

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

RUBINIGG, M.; POSTHUMUS, F.S.; ELZENGA, J.T.M.; STULEN, I. Effect of NaCl salinity on nitrate uptake in *Plantago maritima* L. **Phyton**, v.45, p.295-302, 2005.

SAHU, A.C.; SAHOO, S.K.; SAHOO, N. NaCl-stress induced alteration in glutamine synthetase activity in excised senescing leaves of a salt-sensitive and a salt-tolerant rice cultivar in light and darkness. **Plant Growth Regulation**, v.34, p. 287-292, 2001.

SAI KACHOUT, S.; JAFFEL HAMZA, K.; KARRAY BOURAOUI, N.; LECLERC, J.C.; OUERGHI, Z. Salt-induced changes in antioxidative enzyme activities in shoot tissues of two *Atriplex* varieties. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, p. 115-121, 2013.

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, p. 407-421, 2004.

SCHACHTMAN, D.P.; KUMAR, R.; SCHROEDER, J.I.; MARSH, E.L. Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter LCTI in higher plants. **Proceedings of the Natural Academy of Science USA**, v. 94, p. 11079-11084, 1997.

SCHEIBLE, W. R.; GONZALEZ-FONTEZ, 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. 783-798, 1997.

SCHJOERRING, J. K.; HUSTED, S.; MÄCK, G.; MATTSSON, M. The regulation of ammonium translocation in plants. **The Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 883-890, 2002.

SEEBAUER, J.R.; MOOSE, S.P.; FABBRI, B.J.; CROSSLAND, L.D.; BELOW, F.E. Amino acid metabolism in maize earshoots. Implications for assimilate preconditioning and nitrogen signaling. **Plant Physiology**, v. 136, p. 4326-4334, 2004.

SHAABAN, M.M.; ABOU EL-NOUR, E.A.A. Nutritional status and growth of wheat plants grown under salinity stress conditions as responded to different nitrogen sources. **American Journal of Plant Physiology**, v. 8, p. 32-40, 2013.

SHABALA, S.; SHABALA, S.; CUIN, T.A.; PANG, J.; PERCEY, W.; CHEN, Z.; CONN, S.; EING, C.; WEGNER, L.H. Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley. **The Plant Journal**, v. 61, p. 839-853, 2010.

SHAHID, M.A.A.; PERVEZ, M.A.A.; BALAL, R.M.B; MATTSON, N.S.C; RASHID, A.D; AHMAD, R.E; AYYUB, C.M.A; ABBAS, T.A. Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 500-510, 2011.

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, p.754-762, 2012.

SHANNON, M.C. The effects of salinity on cellular and biochemical processes associated with salt tolerance in tropical plants. In: Davenport, T.L.; Harrington, H.M. (eds.). **Proceedings in Plant Stress in the Tropical Environment**. Kailu-Kona: University of Florida, 1992, p. 56-63.

SHAVIV, A.; HAZAN, O.; NEUMANNA, P.M.; HAGINA, J. Increasing salt tolerance of wheat by mixed ammonium nitrate nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 13, p. 1227-1239, 1990.

SIDDIQI M.Y.; MOLHOTRA 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, M.L.S. **Respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de girassol submetidas à salinidade**. 2013, 65 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SILVEIRA, J.A.G.; MATOS, J.C.S.; CECCATO, V.W.; SAMPAIO, A.H.; COSTA, R.C.L. Induction of nitrate reductase activity and nitrogen fixation in two *Phaseolus* species in relation to exogenous nitrate level. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 4, p. 181-188, 1998.

SILVEIRA, J.A.G.; MELO, A.R.B.; VIÉGAS, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p. 171-179, 2001.

SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; DA ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, A.O.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 115-123, 2003.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K.; ARORA, K. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v. 53, p. 65-73, 2007.

SKOPELITIS, D.S.; PARANYCHIANAKIS, N.V.; PASCHALIDIS, K.A.; PLIAKONIS, E.D.; DELIS, I.D.; YAKOUMAKIS, D.I.; KOUVARAKIS, A.; PAPADAKIS, A.K.; STEPHANOU, E.G.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell**, v. 18, p. 2767-2781, 2006.

SMIDERLE, O.J.; GIANLUPPI, D.; GIANLUPPI, V. Adubação nitrogenada, espaçamento e épocas de semeadura de girassol nos Cerrados de Roraima. In: **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja – 2002: girassol e trigo**. Londrina: Embrapa Soja, 2003. p. 33-39 (Embrapa Soja. Documentos, 218).

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 214-219, 1998.

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; VON WIRÉN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 726–734, 2003.

STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 959–970, 2002.

STÖHR, C.; ULLRICH, W.R. Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 2293-2303, 2002.

SURABHI, G.-K.; ALAVALA MATTA REDDY, A.M.; KUMARI, G.J.; SUDHAKAR, C. Modulations in key enzymes of nitrogen metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with differential sensitivity to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, p. 171-179, 2008.

TABATABAEI, S.J. Effects of salinity and N on the growth, photosynthesis and N status of olive (*Olea europaea* L.) trees. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 432-438, 2006.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2319-2327, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TANG, Z.; LIU, Y.; GUO, X.; ZU, Y. The combined effects of salinity and nitrogen forms on *Catharanthus roseus*: The role of internal ammonium and free amino acids during salt stress. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, p. 135-144, 2011.

TEN HOOPEN, F.; CUIN, T.A.; PEDAS, P.; HEGELUND, J.N.; SHABALA, S.; SCHJOERRING, J.K., JAHN, T.P. Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and Arabidopsis roots: molecular mechanisms and physiological consequences. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2303-2315, 2010..

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1005-1024, 2000.

TOBIN, A.K.; YAMAYA, T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 591–604, 2001.

TSAY, Y.F.; CHIU, C.C.; TSAI, C.B.; HO, C.H.; HSU, P.K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2290-2300, 2007.

UNGARO, M.R.G. **Cultura do girassol**. Instituto Agronômico 36 p. Boletim Técnico n. 188, Biblioteca(s): Embrapa Agroindústria Tropical, 2000.

UNGARO, M.R.; CASTRO, C.; FARIAS, J.R.B.; BARNI, N.A.; RAMOS, N.P.; SENTELHAS, P.C. Girassol. In: MONTEIRO, J.E.B.A. **Agrometeorologia dos Cultivos – o Fator Meteorológico na Produção Agrícola**. Brasília: INMET, 2009. p. 205-221.

USDA-ARS. 2008. Research databases. Bibliography on salt tolerance. George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric. Res. Serv. Riverside, CA. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>

VEERANAGAMALLAIAH, G.; CHANDRAOBULREDDY, P.; JYOTHSNAKUMARI, G.; SUDHAKAR, C. Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica* L.) with differential salt sensitivity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 239–244, 2007.

VON WIREN, N.; GAZZARRINI, S.; GOJON, A.; FROMMER, W.B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p. 254-261, 2000.

WALCH-LIU, P.; NEUMANN, G.; BANGERTH, F.; ENGELS, C. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco, **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 227-237, 2000.

WALLSGROVE, R.M.; TURNER, J.C.; HALL, N.P.; KENDALL, A.C.; BRIGHT, S.W.J. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetic analysis. **Plant Physiology**, v. 83, p. 155-158, 1987.

WANG, X.; BELOW, F.E. Root growth, nitrogen uptake and tillering of wheat induced by mixed-nitrogen source. *Crop Science*, v. 32, p. 997-1002, 1992.

WANG, Y.-Y.; HSU, P.-K.; TSAY, Y.-F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 458-467, 2012.

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

WELLBURN, A.R. 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**, v. 144, p. 307-313, 1994.

WHITE, P.J. The permeation of ammonium through a voltage-independent K^+ channel in the plasma membrane of rye roots. **Journal of Membrane Biology**, v. 152, p. 89-99, 1996.

WILKINSON, J.Q.; CRAWFORD, N.M. Identification and characterization of chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 239, p. 289-297, 1993.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 659-688, 2001.

XIN, Z.L.; MEI, G.; SHIQING, L.B; SHENGXIU, L.; ZONGSUO, L. Growth, water status and photosynthesis in two maize (*Zea mays* L.) cultivars as affected by supplied nitrogen form and drought stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, p. 1995-2001, 2011.

XIONG, L.; ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 131-139, 2002.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p.153-182, 2012.

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

YOUNG, A.; PHILLIP, D.; SAVILL, J. 1997. Carotenoids in higher plant photosynthesis. In: Pessaraki, M. (Ed.) **Handbook of Photosynthesis**. Marcel Dekker, New York, 1997, p. 575-596.

YU, M.; LIU, L.; GUO, Q.; YAO, Q.; ZHAO, N.; CHEN, Y. Influence of nitrogen forms ratio on growth and photosynthetic characteristics in *Prunella vulgaris*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 36, p. 530-534, 2011.

YU, S.; WANG, W.; WANG, B. Recent progress of salinity tolerance research in plants. **Russian Journal of Genetics**, v. 48, p. 497-505, 2012.

ZERIHUM, A.; MCKENZIE, B.A.; MORTON, J.D. Photosynthate cost associated with the utilization of different nitrogen forms: influence on the carbon balance of plants and shoot-root biomass partitioning. **New Phytologist**, v. 138, p. 1-11, 1998.

ZHANG, F.; NIU, J.; ZHANG, W.; CHEN, X.; LI, C.; YUAN, L.; XIE, J. Potassium nutrition of crops under varied regimes of nitrogen supply. **Plant and Soil**, v. 335, p. 21-34, 2010.

ZHU, J.K. Plant Salt tolerance. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 53, p. 247-273, 2002.

ZHU, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 441-445, 2003.