



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

**GYEDRE DOS SANTOS ARAÚJO**

**EFICIÊNCIA DO APARATO FOTOSSINTÉTICO E O METABOLISMO DO**  
**NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS**  
**DE GIRASSOL COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SALINIDADE**

**FORTALEZA**

**2015**

GYEDRE DOS SANTOS ARAÚJO

EFICIÊNCIA DO APARATO FOTOSSINTÉTICO E O METABOLISMO DO  
NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS  
DE GIRASSOL COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SALINIDADE

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

FORTALEZA

2015

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

- 
- A689e Araújo, Gyedre dos Santos.  
Eficiência do aparato fotossintético e o metabolismo do nitrogênio em genótipos de girassol com tolerância diferencial à salinidade / Gyedre dos Santos Araújo. – 2015.  
81 f. : il. color., ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.  
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. Aclimação. 2. Assimilação de nitrogênio. 3. Estresse salino. 4. Fotossíntese. 5. *Helianthus annuus*. I. Título.

---

CDD 574.192

GYEDRE DOS SANTOS ARAÚJO

EFICIÊNCIA DO APARATO FOTOSSINTÉTICO E O METABOLISMO DO  
NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS  
DE GIRASSOL COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SALINIDADE

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 30 de janeiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. José Tarquínio Prisco (Conselheiro)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Marlos Alves Bezerra (Conselheiro)  
Embrapa Agroindústria Tropical

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar-me sempre;

Aos meus queridos pais, Antonia dos Santos Araújo e Joaquim Bizerra de Araújo, por acreditarem em mim e me apoiarem sempre na busca do conhecimento;

À minha querida irmã, Gessica dos Santos Araújo, pela ajuda, carinho e companheirismo;

Ao meu noivo, João Paulo de Sousa Almeida, pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador, Enéas Gomes Filho, pela orientação, apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Aos professores, Dr. Marlos Alves Bezerra e Dr. José Tarquínio Prisco, por aceitarem o convite em participar da banca examinadora desta dissertação.

Ao amigo Rafael de Souza Miranda pelo ajuda, apoio, dedicação e por seu empenho em passar o máximo de conhecimento.

Aos demais amigos e colegas do LABFIVE: Rosilene Mesquita, Elton Marques, Luckas Huriel, Stelamaris Paula, Daniel Oliveira, Cibele Gadelha, Paulo André, Lineker Lopes, Nathalia Amaral, Thiago Augusto, Nara Lídia, Valdinéia Soares, Alexcyane Feijão, Liliane Santos, Viviane Ruppenthal, que me ajudaram direta ou indiretamente e pela convivência durante a realização deste trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa de estudos a mim concedida.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal/ CNPq) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram desta importante etapa da minha vida e que não foram supracitados, o meu sincero agradecimento.

## RESUMO

A busca por cultivares/genótipos com alta capacidade de crescer em solos salinos tem sido intensificada nos últimos anos. Em adição aos estudos de engenharia genética, a seleção de espécies que apresentam maior tolerância ao estresse salino torna-se fundamental para o cultivo de plantas em ambientes salinizados. Neste estudo, dois genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) foram cultivados em solução nutritiva na ausência (controle) e na presença de NaCl a 100 mM (estresse salino), com o objetivo de identificar possíveis mecanismos fisiológicos e bioquímicos que pudessem estar correlacionados com a tolerância diferencial à salinidade. Após análises dos efeitos do NaCl no crescimento, observou-se que o genótipo BRS 321 mostrou maior tolerância à salinidade do que o Catissol. O melhor desempenho das plantas do genótipo BRS 321 foi acompanhado com maiores taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> e com maiores quantidades de pigmentos fotossintéticos. Uma melhor eficiência da maquinaria fotossintética, evidenciada pelas maiores eficiência efetiva do PSII e a taxa de transporte de elétrons, também foi observada nesse genótipo, quando comparado com o genótipo Catissol. Além disso, o genótipo mais tolerante apresentou um melhor controle da homeostase iônica sob salinidade, resultante do menor acúmulo de Na<sup>+</sup> e dos maiores teores de K<sup>+</sup> nos tecidos radiculares. Também, a melhor eficiência em transportar, pelo xilema, o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para os tecidos aéreos, associada à assimilação do nitrogênio, provavelmente atuou como dreno alternativo na dissipação do excesso de energia na cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto. Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que o aumento da tolerância de plantas de girassol à salinidade é decorrente da melhor performance do aparato fotossintético acoplada a uma eficiente assimilação do nitrogênio.

**Palavras-chave:** Aclimação. Assimilação do nitrogênio. Estresse salino. Fotossíntese. *Helianthus annuus*.

## ABSTRACT

The search for cultivars/genotypes with high ability to grow in saline soils has been intensified in recent years. In addition to genetic engineering studies, selection of species with higher salt tolerance becomes essential for cultivation of plants in saline environments. In this study, two sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) were grown in nutrient solution in the absence (control) and presence of 100 mM NaCl (salt stress), in order to identify possible physiological and biochemical mechanisms that could be correlated with the differential tolerance to salinity. After analysis of the effects of NaCl on growth, it was observed BRS 321 genotype showed increased tolerance to salinity than Catissol genotype. The better performance of BRS 321 genotype plants was directly related to the higher CO<sub>2</sub> assimilation rates and photosynthetic pigments. The better efficiency in photosynthetic machinery evidenced by higher effective efficiency of PSII and electron transport rate, also observed in this genotype, when compared with Catissol genotype. Furthermore, the more tolerant genotype showed an effective control of homeostasis in salinity, due to lower accumulation of Na<sup>+</sup> in root tissue and higher K<sup>+</sup> levels. Also, the best efficiency in transport, via xylem, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> for shoots tissues, associated with massive nitrogen assimilation, probably served as alternate drain on dissipation of excess energy in transport chain electron of chloroplast. The data obtained in this study allow us to conclude that increased tolerance of sunflower plants to salinity is due to the better performance in photosynthetic apparatus coupled to an efficient assimilation of nitrogen.

**Keywords:** Acclimation. *Helianthus annuus*. Nitrogen assimilation. Photosynthesis. Salt stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Massas secas da parte aérea, das raízes e total e área foliar de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....35
- Figura 2** - Teor relativo de água de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....36
- Figura 3** - Teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *total* e de carotenóides de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....37
- Figura 4** - Teores de antocianinas de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....39
- Figura 5** - Fotossíntese líquida, taxa de transpiração, condutância estomática e eficiência da carboxilação medidas entre 10:30 h e 11:30 h, no dia anterior à coleta, de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....40
- Figura 6** - Teores de sódio, potássio e relação em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....43
- Figura 7** - Concentrações de sódio e potássio na seiva do xilema de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....44
- Figura 8** - Teores de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....46
- Figura 9** - Teores de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na seiva do xilema de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....47

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 10</b> - Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....                     | 48 |
| <b>Figura 11</b> - Atividade da redutase do nitrito em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....                     | 50 |
| <b>Figura 12</b> - Atividade da sintetase da glutamina em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....                  | 51 |
| <b>Figura 13</b> - Atividade da sintase do glutamato em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....                    | 52 |
| <b>Figura 14</b> - Teores de N-aminossolúveis em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....                           | 53 |
| <b>Figura 15</b> - Teores dos aminoácidos glutamato, glutamina e serina em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM ..... | 55 |
| <b>Figura 16</b> - Teores dos aminoácidos aspartato e asparagina em folhas e raízes de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sob estresse salino com NaCl a 100 mM .....        | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Eficiência efetiva do fotossistema II, eficiência máxima do fotossistema II, “quenching” não-fotoquímico, “quenching” fotoquímico e taxa de transporte de elétrons de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, após 15 dias de estresse salino com NaCl a 100 mM ..... | 41 |
|--|----|

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>13</b> |
| 1.1      | Justificativa.....   | 13        |
| 1.2      | Objetivos .....  | 15        |
| 1.2.1    | <i>Objetivo geral</i> .....  | 15        |
| 1.2.2    | <i>Objetivos específicos</i> .....   | 15        |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>   | <b>16</b> |
| 2.1      | Aspectos gerais do estresse salino em plantas .....                          | 16        |
| 2.2      | Tolerância das plantas à salinidade .....                                    | 17        |
| 2.3      | Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em plantas sob salinidade..... | 19        |
| 2.4      | Dinâmica e metabolismo do nitrogênio em plantas .....                        | 21        |
| 2.5      | A cultura do girassol .....  | 24        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>26</b> |
| 3.1      | Material vegetal e condições experimentais.....                              | 26        |
| 3.2      | Coleta das plantas e medidas de crescimento.....                             | 26        |
| 3.3      | Determinação do teor relativo de água.....                                   | 27        |
| 3.4      | Determinação de pigmentos fotossintéticos .....                              | 27        |
| 3.5      | Determinação de antocianinas.....  | 28        |
| 3.6      | Medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila .....              | 28        |
| 3.7      | Determinação dos teores de íons inorgânicos .....                            | 29        |
| 3.8      | Atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio .....                      | 30        |
| 3.8.1    | <i>Redutase do nitrato (NR) in vivo</i> .....                                | 30        |
| 3.8.2    | <i>Redutase do nitrito (NiR)</i> .....                                       | 31        |
| 3.8.3    | <i>Sintetase da glutamina (GS)</i> .....                                     | 32        |
| 3.8.4    | <i>Sintase do glutamato (GOGAT)</i> .....                                    | 32        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.9      | Determinação dos teores de proteínas .....  | 33        |
| 3.10     | Determinação dos teores de N-aminossolúveis.....  | 33        |
| 3.11     | Determinação dos teores de aminoácidos livres .....   | 34        |
| 3.12     | Delineamento experimental e análise estatística.....  | 35        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>36</b> |
| 4.1      | Crescimento vegetativo .....  | 36        |
| 4.2      | Teor relativo de água.....  | 36        |
| 4.3      | Pigmentos fotossintéticos e antocianinas .....  | 36        |
| 4.4      | Trocas gasosas.....   | 40        |
| 4.5      | Fluorescência da clorofila .....  | 40        |
| 4.6      | Teores de íons.....   | 43        |
| 4.7      | Assimilação do nitrogênio.....  | 47        |
| 4.8      | N-aminossolúveis .....  | 51        |
| 4.9      | Aminoácidos livres.....   | 56        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>60</b> |
| 5.1      | Genótipos de girassol exibem tolerância diferencial à salinidade.....   | 60        |
| 5.2      | Os pigmentos fotossintetizantes tem influência direta na performance fotossintética de plantas tolerantes à salinidade .....          | 63        |
| 5.3      | A eficiência do fotossistema II revela papel chave na fotossíntese e na aclimação de plantas de girassol ao estresse salino .....     | 64        |
| 5.4      | A assimilação do nitrogênio pode estar envolvida na redução dos efeitos deletérios da salinidade sob a maquinaria fotossintética..... | 66        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>   | <b>69</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>70</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativa

A salinidade é um dos principais estresses abióticos que restringem a produtividade das culturas em todo o mundo e que afeta quase todas as características fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares das plantas (GORAI; NEFFATI, 2007; SHAVRUKOV, 2013), em decorrência de seus efeitos osmóticos e iônicos (MUNNS, TESTER, 2008; SILVA *et al.*, 2013). De um modo geral um solo é considerado salino quando a quantidade de sais existentes é capaz de prejudicar o desenvolvimento das plantas. Para a maioria das culturas isso ocorre quando a condutividade elétrica do extrato de saturação é igual ou superior a  $2 \text{ dS m}^{-1}$  (HOLANDA *et al.*, 2010). A maioria das áreas afetadas pela salinidade ocorre naturalmente. Entretanto, uma proporção significativa de áreas cultiváveis tem se tornado salina devido a retirada da vegetação e irrigações com água salina (MUNNS, TESTER, 2008). Estima-se que 800 milhões de hectares em todo o mundo são afetados por sais, o que corresponde a quase um terço das terras agriculturáveis (FAO, 2012). No Brasil, os solos afetados por sais estão em torno de 20 a 25% das terras agriculturáveis, concentrados principalmente na região Nordeste (FAO, 2012).

Durante o estresse salino, a fotossíntese e o crescimento celular podem ser afetados (MUNNS *et al.* 2006; NEBAUER, 2013) pelas alterações no metabolismo fotossintético (LAWLOR; CORNIC, 2002; CHAVES *et al.*, 2011; HUANG, 2014), como também pelo estresse oxidativo. Em plantas C3, os efeitos negativos iniciais do estresse salino na fotossíntese podem ser decorrentes do decréscimo da disponibilidade do  $\text{CO}_2$ , como resultado da limitação da difusão estomática e mesofílica (FLEXAS *et al.*, 2004). Mais tardiamente, a salinidade afeta a fotossíntese por meio de mecanismos não estomáticos, reduzindo o conteúdo total de clorofila, o transporte de elétrons nos cloroplastos e, conseqüentemente, causando um decréscimo na eficiência do fotossistema II (ARAGÃO *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2012).

Dentre outros processos, a salinidade interfere na aquisição e na utilização do N. O nitrogênio (N) está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (MORALES *et al.*, 2006). A salinidade pode 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 (DLUZNIEWSKA *et al.*, 2007;

ARAGÃO *et al.*,2012). A absorção e assimilação de N pela planta são processos multirregulados e integrados ao metabolismo geral da planta. A multirregulação do metabolismo do N torna complexa a identificação de pontos metabólicos específicos que sejam mais limitantes para o incremento da produtividade (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

O girassol é uma oleaginosa que responde por aproximadamente 13% do óleo vegetal produzido mundialmente e está inserido entre as espécies vegetais de maior potencial para a produção de biocombustível. Todas as partes desta cultura são aproveitadas de forma econômica, incluindo os grãos, os restos da cultura e os subprodutos oriundos da extração do óleo, tais como, as tortas e/ou farinhas, que podem se utilizados na alimentação animal (NOBRE *et al.*, 2010). Em função do elevado teor de óleo encontrado em suas sementes e pela ampla adaptação a diferentes regiões edafoclimáticas (MORAIS *et al.*, 2011), o girassol possui um grande potencial econômico, o que torna sua utilização viável no Programa Nacional do Biodiesel.

As características climáticas encontradas no Nordeste do Brasil propiciam a exploração dessa espécie, porém, a ocorrência da salinização dos solos tem provocado à redução da produtividade e da área cultivável. Portanto, o desenvolvimento de cultivares de girassol tolerantes à salinidade pode ser uma ferramenta promissora na utilização econômica de solos salinos (SHAHBAZ *et al.*, 2011). Por isso, a compreensão de mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos com a salinidade é um pré-requisito para auxiliar o melhoramento genético dessa cultura.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 *Objetivo geral*

Estudar a influência do estresse salino em genótipos de girassol, buscando características que possam estar relacionadas com a tolerância diferencial dessa espécie à salinidade, visando auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas respostas dessa espécie a tais condições.

### 1.2.2 *Objetivos específicos*

- Verificar o efeito da salinidade no crescimento (área foliar, matérias secas da parte aérea e raízes) e no teor relativo de água de plantas de girassol;
- Analisar o efeito do estresse salino nos pigmentos fotossintéticos, nas trocas gasosas e nos parâmetros de fluorescência da clorofila de plantas de girassol;
- Investigar o efeito do NaCl no acúmulo e distribuição de íons ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) em folhas, seiva do xilema e raízes de plantas de girassol;
- Estudar o efeito da salinidade na atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio (redutase do nitrato, redutase do nitrito, sintetase da glutamina e sintase do glutamato) de plantas de girassol;
- Investigar as alterações no acúmulo de compostos nitrogenados (N-aminossólúveis e aminoácidos livres) de plantas de girassol expostas ao estresse salino;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais do estresse salino em plantas

A salinidade é um dos principais fatores limitantes da produção agrícola, em razão dos seus efeitos no crescimento e no desenvolvimento vegetal – os quais podem ser de natureza iônica, osmótica ou ambas (MUNNS; TESTER, 2008; PRISCO; GOMES-FILHO, 2010). Com isso, o cultivo de várias espécies de interesse econômico em diversas regiões está se tornando impraticável, devido à incapacidade dessas sobreviverem à ambientes salinizados.

A elevada concentração de sais diminui o potencial osmótico do solo, restringindo a capacidade das plantas de absorver água, resultando em um estresse osmótico (ou estresse hídrico) (MARSCHNER, 1995). O crescimento vegetativo é, então, afetado por meio da redução da pressão de turgescência, causando inibição da expansão celular e resultando em plantas atrofiadas e desidratadas (ASHRAF; HARRIS, 2004). O déficit hídrico induzido pela salinidade acarreta no fechamento estomático, limitando a assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, e reduzindo a produção de fotoassimilados (HUANG, 2014).

Em adição, os sais absorvidos pelo fluxo transpiratório podem causar injúrias ao atingir níveis tóxicos nos tecidos, causando o chamado estresse iônico e, eventualmente, a morte da planta (MUNNS; TESTER, 2008; MILLER *et al.*, 2010). Os danos causados pelo acúmulo de íons tóxicos variam com o tempo de exposição ao sal e da efetividade de sua compartimentalização nos tecidos e nas células do vegetal (PARVAIZ; SATYAWATI, 2008).

A interação dos sais com os nutrientes minerais presentes no solo é outra consequência do estresse salino, resultando em desbalanços e deficiências nutricionais na planta (KEUTGEN; PAWELZIK, 2009). A salinidade afeta a atividade dos íons em solução e os processos de absorção, transporte, assimilação e distribuição de nutrientes na planta. Isto pode resultar do efeito dos sais sobre a disponibilidade do nutriente, pela competição na absorção, no transporte ou partição dentro da planta, na integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, na redução da atividade de várias enzimas vitais, bem como pela inativação fisiológica de um dado nutriente, resultando no aumento do requerimento da planta por esse elemento essencial (ZHU, 2003; MANSOUR; SALAMA, 2004; ABOGADALIA *et al.*, 2010).

Vários estudos têm evidenciado a concorrência entre os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  pelos sítios de absorção das raízes, mesmo com a alta afinidade dos sistemas de transporte de  $\text{K}^+$ , o que leva a redução dos teores de  $\text{K}^+$  intracelulares (KAYA *et al.*, 2007; ALEMÁN *et al.*, 2011; PARDO; RUBIO, 2011). A atividade da maioria das enzimas citosólicas é, então, afetada pela perturbação da homeostase do potássio.

Além disso, o estresse salino provoca um desequilíbrio no estado redox das células, gerando um estresse oxidativo nas células das plantas, através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*) (CUIN; SHABALA, 2007; YAMANE *et al.*, 2012; GONDIM *et al.*, 2012). As ROS são altamente reativas e prejudiciais ao metabolismo das plantas, causando danos oxidativos às proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana (MØLLER *et al.*, 2007).

A tolerância das plantas ao estresse salino varia amplamente entre as espécies e depende da concentração e do tempo de exposição aos sais, das condições ambientais e da interação com outros estresses (BRAY *et al.*, 2000). Apesar das glicófitas serem sensíveis aos sais e não tolerarem longa ou mesmo breve exposição à ambientes salinizados, algumas espécies exibem mecanismos que possibilitam a sobrevivência dessas espécies nesse tipo de ambiente (BAVEI *et al.*, 2011). Essa sobrevivência, em grande parte resultou da manutenção da homeostase iônica intracelular, a qual é importante para a manutenção dos processos metabólicos que controlam o crescimento e desenvolvimento vegetal (GHARS *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2013). Dessa forma, processos fisiológicos importantes, tais como, as rotas de efluxo e a compartimentalização dos íons tóxicos no vacúolo e o controle de seu transporte para as folhas podem conferir tolerância aos sais (MUNNS; TESTER, 2008).

## **2.2 Tolerância das plantas à salinidade**

De acordo com a tolerância aos sais, as plantas podem ser agrupadas em dois grandes grupos: as halófitas e as glicófitas (FAGERIA; GHEYI, 1997). Enquanto as halófitas são capazes de crescerem em solos com concentração de sais de até 20%, a maioria das plantas cultivadas (glicófitas), tem seu crescimento inibido em concentrações da ordem de 0,3 a 0,5% (LEVITT, 1980). Os mecanismos de tolerância à salinidade em plantas podem ser de dois tipos: aqueles que minimizam a entrada de sal na planta, e aqueles que minimizam a concentração de

sais no citosol. As halófitas, plantas tolerantes à salinidade, apresentam ambos os mecanismos mencionados. Elas excluem o sal eficientemente, embora, também compartimentalizem no vacúolo o sal absorvido do meio (AMOR *et al.*, 2005). As glicófitas, diferentemente das halófitas, não possuem características ou alterações morfo-fisiológicas específicas tão eficientes à tolerância aos sais, de maneira que seus processos metabólicos são afetados negativamente com o aumento da concentração de sais solúveis na solução do solo (GREENWAY; MUNNS, 1980).

Para fazer frente aos efeitos danosos causados pela salinidade, muitas plantas desenvolvem ao longo da evolução alguns mecanismos de tolerância aos estresses. Basicamente elas são capazes de amenizar, ou em alguns casos até neutralizar, os efeitos negativos da salinidade pela ativação de respostas bioquímicas que incluem: (i) síntese e acúmulo de osmólitos; (ii) manutenção da homeostase iônica intracelular; (iii) alterações na fotossíntese; (iv) modificação na composição estrutural das membranas; (v) alteração na indução de fitohormônios e; (vi) mecanismos de eliminação de espécies reativas de oxigênio, geradas como efeito secundário do estresse (GONDIM *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2013).

Para a ocorrência da tolerância ao estresse salino, é necessário que solutos se acumulem no citosol e organelas, promovendo, além do ajustamento osmótico, um quadro de osmoproteção (RHODES; HANSON, 1993; CHEN *et al.*, 2007). Taiz e Zeiger (2010) definem “ajustamento osmótico” (ou, ainda segundo estes autores, acúmulo de solutos pelas células) como um processo no qual o potencial hídrico pode ser diminuído sem a diminuição da turgescência ou do volume celular através de aumentos no conteúdo de solutos por célula. O ajustamento osmótico, em nível celular, é um exemplo de mecanismo que evita maiores danos provocados pelo estresse hídrico, favorecendo a absorção de água, e por consequência, a manutenção do turgor celular (ZHOU; YU, 2010).

Os solutos que promovem o ajustamento osmótico são chamados de solutos compatíveis (ou osmólitos compatíveis), os quais podem se acumular em grandes quantidades sem prejudicar as funções enzimáticas (TAIZ; ZEIGER, 2010). Em geral, solutos compatíveis podem ser íons essenciais (como o  $K^+$ ), mas a maior parte são solutos orgânicos (HUSSAIN *et al.*, 2010), tais como açúcares (frutose, glicose, glicerol, inosítois metilados, trealose, rafinose, frutanos etc.), aminoácidos e derivados (prolina, glicina-betaína,  $\beta$ -alanina-betaína, prolina-betaína etc.) e alguns compostos sulfônicos (CORDEIRO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2013).

A limitação da entrada de  $\text{Na}^+$  na raiz, bem como a distribuição do  $\text{Na}^+$  para os órgãos da planta e a manutenção da homeostase iônica intracelular pela compartimentalização do íon nos vacúolos são mecanismos de grande importância para a tolerância do vegetal ao meio salino (RUIZ-LOZANO *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, a importância da manutenção de elevadas proporções  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  no citosol para a tolerância à salinidade está se tornando cada vez mais difundida. As concentrações relativas de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Na}^+$  no citoplasma são essenciais para a atividades de muitas enzimas, para a manutenção do potencial de membrana e de níveis osmóticos adequados nas células (DING *et al.*, 2010; ABIDEEN *et al.*, 2014). Para tanto, as plantas utilizam de grande variedade de proteínas transportadoras, localizadas na membrana plasmática e no tonoplasto. Estas proteínas são essenciais para promover o transporte de solutos e para compartimentalizar íons citotóxicos fora do citosol, facilitando ainda a função destes íons como sinalizadores (HUSSAIN *et al.*, 2010).

### **2.3 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas sob salinidade**

A fotossíntese, um processo que converte dióxido de carbono em compostos orgânicos, utilizando água e energia solar (NAJAFPOUR; PASHAEI, 2012), é vista como a base para sustentar o processo de vida das espécies do planeta (GOVINDJEE, 2005). Como parte desse processo, as plantas absorvem luz primariamente usando pigmentos, sendo a clorofila *a* uma das moléculas centrais, que absorvem a energia da luz do sol e utiliza essa energia para sintetizar carboidratos a partir de  $\text{CO}_2$  e água (TAIZ; ZEIGER, 2010). A fotossíntese, em plantas, engloba duas etapas de reações: uma chamada de reações fotoquímicas e outra de reações bioquímicas ou de assimilação/fixação do carbono. Nas reações fotoquímicas, a clorofila e outros pigmentos fotossintéticos das células absorvem a energia luminosa e a conserva como ATP e NADPH, ao mesmo tempo que moléculas de  $\text{O}_2$  são formadas. Nas reações de assimilação do carbono, o ATP e o NADH gerados são usados para reduzir o  $\text{CO}_2$  para formar trioses fosfatadas, e daí amido, sacarose e seus produtos derivados numa sequência de reações (TAKAHASHI; MURATA, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2010).

Durante o estresse salino, as mudanças nas relações hídricas associadas com o acúmulo de íons no interior dos tecidos fotossintéticos têm implicações consideráveis para a atividade

fotossintética das plantas. Vários estudos mostram que a redução no crescimento das plantas pode ser acompanhada por decréscimo na taxa de fotossíntese (AZEVEDO-NETO *et al.*, 2004; OMOTO *et al.*, 2010; ZAHRA *et al.*, 2014). Segundo Munns e Tester (2008), a resposta mais dramática da salinidade nas plantas é a diminuição na abertura estomática. As respostas estomáticas são induzidas pelo efeito osmótico do sal fora das raízes, ou seja, a condutância estomática é imediatamente afetada pela salinidade devido, primeiramente, ao desequilíbrio hídrico provocado. A resposta estomática é provavelmente regulada por sinais da raiz em situações de estresse hídrico, principalmente, através do hormônio ácido abscísico (ABA), que é acumulado nestas condições (DAVIES *et al.*, 2005; JANICKA-RUSSAK; KLOBUS, 2007; ZÖRB *et al.*, 2013). Por exemplo, em plantas de feijoeiro submetidas a 75 mM NaCl, o acúmulo excessivo de Na<sup>+</sup> interfere na nutrição de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e promove distúrbios na regulação dos estômatos, que resulta na diminuição da fotossíntese (TAVAKKOLI *et al.* 2010). Além de afetar a condutância estomática, o efeito osmótico da salinidade prejudica também a taxa fotossintética pela diminuição da expansão foliar (TEAKLE; TYERMAN, 2010).

Os efeitos iônicos decorrentes da salinidade podem reduzir o conteúdo total de clorofila e limitar o transporte de elétrons nos cloroplastos, causando decréscimos na eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII) (SUDHIR; MURTHY, 2004; SALEEM *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2013b). Além disso, os pigmentos fotossintéticos são bons indicadores do nível de estresse das plantas, por isso seus teores são frequentemente monitorados durante o período de estresse, através de medidas da coloração de folhas e estimativa da concentração de clorofila (GARG; SINGLA, 2004; HEIDARI *et al.*, 2011).

Ocorrendo a excitação das moléculas de clorofila, parte dos elétrons são transferidos para o *pool* de plastoquinonas e daí seguindo na cadeia transportadora de elétrons dos tilacóides. Entretanto, parte dos elétrons voltam ao estágio inicial, fazendo com que parte da energia absorvida pelos pigmentos fotossintéticos seja emitida como fluorescência (BAKER, 2008). O uso de medidas de fluorescência da clorofila *a* tem sido difundido principalmente no estudo de fotossíntese por ser um método não destrutivo e que permite analisar qualitativa e quantitativamente a absorção e o aproveitamento da energia luminosa através do PSII, bem como as possíveis relações com a capacidade fotossintética (ARAGÃO *et al.*, 2012).

Quando as plantas são expostas à luz, os centros de reação do PSII são progressivamente reduzidos. Dois parâmetros básicos descrevem a extinção da fluorescência da clorofila *a*: o *quenching* fotoquímico (qP) e o *quenching* não fotoquímico (NPQ) (BAKER, 2008). O

*quenching* fotoquímico (qP) representa a proporção de energia dos fótons capturada pelos centros de reação do PSII abertos e dissipada via transporte de elétrons para a fotossíntese (JUNEAU *et al.*, 2005). Paralelamente, o *quenching* não fotoquímico (NPQ) representa a queda na fluorescência devido a fatores não fotoquímicos, especialmente devido a um aumento na perda de energia absorvida via dissipação térmica (JUNEAU *et al.*, 2005), processo correlacionado com a formação de zeaxantina (BAKER, 2008).

As medidas de fluorescência da clorofila *a* têm se mostrado uma ferramenta muito informativa para o estudo dos efeitos de diferentes estresses ambientais sobre a fotossíntese (KALAJI *et al.*, 2011). Nesse caso, parâmetros como a eficiência máxima do fotossistema II ( $\phi$ PSII), estimada através da razão entre a fluorescência variável e a máxima (Fv/Fm), expressam o rendimento quântico do processos fotoquímico (neste fotossistema), dando uma ideia da eficiência relativa da captura de energia luminosa (BAKER, 2008).

Portanto, medidas simultâneas de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas das plantas permitem um melhor entendimento dos efeitos da salinidade sobre o aparato fotossintético. Essas medidas têm provado serem bastante úteis na seleção de plantas com tolerância à estresses abióticos (GLYNN *et al.*, 2003; RAZAVI *et al.*, 2008; LIMA NETO *et al.*, 2014).

## **2.4 Dinâmica e metabolismo do nitrogênio em plantas**

O nitrogênio (N) é quantitativamente o nutriente mais importante para o crescimento e produtividade das plantas, sendo o constituinte de biomoléculas essenciais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas, enzimas, nucleotídeos (ácidos nucléicos) e outros metabólitos (HARPER, 1994; MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010).

No solo, a forma nitrogenada geralmente disponível para as plantas é a nítrica (N-NO<sub>3</sub>) ou a amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), sendo a primeira a mais abundante, em consequência do processo de nitrificação por bactérias que provocam a oxidação do amônio livre produzindo nitrato. No entanto, conforme as condições do solo, a forma amoniacal pode ser a mais abundante pela inibição desses organismos. (FORDE, 2002; SODEK, 2008; HELALI *et al.*, 2010).

As plantas absorvem os íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  presentes na solução do solo através da membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz, principalmente nas regiões mais jovens (região apical) (TAIZ; ZEIGER, 2010; ZHONGHUA *et al.*, 2011). Uma vez no interior da célula, o  $\text{NO}_3^-$  pode assumir quatro rotas diferentes: (a) ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$ , 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  $\text{NO}_3^-$  absorvido é assimilado nas raízes (CRAWFORD; GLASS, 1998; TAIZ; ZEIGER, 2010; XU *et al.*, 2012). Diferentemente do  $\text{NO}_3^-$ , o  $\text{NH}_4^+$ , por seus efeitos tóxicos, em geral, é completamente convertido em N orgânico nas raízes, antes de serem translocados para as outras partes da planta (RAVEN; SMITH, 1976).

Para que possa ser incorporado em estruturas orgânicas e cumprir suas funções essenciais como nutriente para as plantas, o  $\text{NO}_3^-$  deve ser inicialmente reduzido a  $\text{NH}_4^+$  (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010). O íon  $\text{NO}_3^-$  é reduzido pela reação sequencial da redutase do nitrato (NR, EC 1.6.6.1), no citosol, e da redutase do nitrito (NiR, EC 1.6.6.4), nos plastídios e/ou cloroplastos. O íon  $\text{NH}_4^+$  derivado da redução primária do  $\text{NO}_3^-$ , bem como de outras vias metabólicas (absorção direta pelas raízes, fotorrespiração e catabolismo dos aminoácidos) é então incorporado ao  $\alpha$ -cetoglutarato, formando a glutamina, pela ação da enzima sintetase da glutamina (GS, EC 6.3.1.2) e esta, é convertida em glutamato, pela ação da enzima sintase do glutamato [Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1), NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14) e NADPH-GOGAT (EC 1.4.1.13)] (IRELAND; LEA, 1999). O íon  $\text{NH}_4^+$  pode também ser assimilado por uma via alternativa, através da reação reversível da enzima glutamato desidrogenase (NADH-GDH, EC 1.4.7.1), que participa de uma rota alternativa e realiza a aminação do  $\alpha$ -cetoglutarato (MIFLIN; HABASH, 2002; KANT *et al.*, 2007). Acredita-se, no entanto, que esta via somente ocorre em condições de excesso de amônio (BUCHANAN *et al.*, 2000), não representando, todavia, rota significativa de assimilação de N.

A NR é a enzima que catalisa o primeiro passo da redução do  $\text{NO}_3^-$  e está localizada no citosol (TISCHNER, 2000; XU *et al.*, 2012). A isoforma mais comum da NR é NADH-específica, no entanto, em tecido aclorofilados, tal como a raiz, há outra isoforma, a qual pode utilizar tanto o NADH como o NADPH como doadores de elétrons (WILKINSON; CROWFORD, 1993).

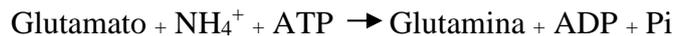


O  $\text{NO}_2^-$  formado na reação catalisada pela NR, por ser bastante tóxico, deve ser rapidamente transportado para o interior dos cloroplastos, nas folhas, ou dos plastídios, nas raízes. Nessas organelas, a NiR reduz o  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$ , de acordo com a seguinte reação geral:



onde  $\text{Fd}_{\text{red}}$  e  $\text{Fd}_{\text{ox}}$  representam a ferredoxina na forma reduzida e oxidada, respectivamente. Nos cloroplastos, o doador de elétrons para a NiR é a  $\text{Fd}_{\text{red}}$  derivada do transporte de elétrons das reações fotoquímicas da fotossíntese e, nos tecidos aclorofilados, a  $\text{Fd}_{\text{red}}$  é originada do NADPH gerado pela via das pentoses-fosfato (MARSCHNER, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2010).

Como elevados níveis de  $\text{NH}_4^+$  são tóxicos à célula, as plantas evitam essa toxicidade pela rápida conversão do  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos. A GS cataliza a condensação, dependente de ATP, do  $\text{NH}_4^+$  com o glutamato para formar a glutamina, conforme a reação abaixo:



A GS é muitas vezes encontrada como múltiplas isoenzimas, localizadas no citosol (GS1) e no cloroplasto/plastídio (GS2), as quais possuem papéis distintos (KUSANO *et al.*, 2011). A GS1 citosólica desempenha um importante papel na assimilação primária do N nas raízes, e sua função é gerar glutamina para ser transportada pelo floema. Já a GS2 cloroplastídica possui um papel crucial na reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  liberado na fotorrespiração das plantas (IRELAND; LEA, 1999, XU *et al.*, 2012).

A glutamina 2-oxoglutarato aminotranferase (GOGAT), ou sintase do glutamato, catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato ( $\alpha$ -cetoglutarato), produzindo duas moléculas de glutamato (MILLER; CRAMER, 2004; XU *et al.*, 2012).



As plantas possuem dois tipos de GOGAT: uma, utiliza o NADH como poder redutor e a outra utiliza a ferredoxina reduzida (TAIZ; ZEIGER, 2010). A NADH-GOGAT está localizada nos plastídios de tecidos não-fotossintetizantes e está envolvida com a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  absorvido da rizosfera. A GOGAT dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) é encontrada nos cloroplastos e sua função é agir no processo de fotorrespiração. O ciclo GS/GOGAT produz glutamina e glutamato, que atuam como aminoácidos iniciadores para

várias vias envolvidas com a síntese de outros aminoácidos, proteínas e compostos essenciais para o crescimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2010).

A salinidade afeta negativamente o processo de absorção de nutrientes pelas plantas, principalmente do íon nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), que é a principal fonte de nitrogênio em solos agrícolas e o que mais frequentemente limita o crescimento de plantas (ARAGÃO *et al.*, 2011). É relatado ainda que o estresse salino afeta fortemente o metabolismo de nitrogênio em plantas, pela inibição nas atividades das enzimas envolvidas, tais como NR e NiR (MUNNS; TESTER, 2008; DEBOUBA *et al.*, 2013). Tanto diminuições (QASIM *et al.*, 2002; BYBORDI; EBRAHIMIAN, 2011) como aumentos (BYBORDI; EBRAHIMIAN, 2011; AVERINA *et al.*, 2012), nas atividades dessas enzimas em razão do estresse salino foram relatados. QASIM *et al.* (2002) e GARG; SIGLA (2005) encontraram que a alta atividade da NR em plantas tolerantes ao sal, em comparação à plantas sensíveis, fornecem evidências de que essa enzima promove algum mecanismo de tolerância nas plantas ao estresse salino.

Nos cloroplastos, a assimilação de N depende do poder redutor, produzido pela transferência de elétrons gerados pela fotossíntese, o qual ocorre através de uma série de complexos de proteínas nas membranas dos tilacóides (WILHELM; SELMAR, 2011). Estudos recentes têm destacado ainda o papel da assimilação de N como um importante dreno alternativo para dissipação de elétrons na cadeia transportadora de elétrons de plantas sob estresses abióticos (CABELLO-PASINI *et al.*, 2011; ARAGÃO *et al.*, 2012).

Assim, o estudo do efeito de salinidade sobre o metabolismo, especialmente na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio pode fornecer informações adicionais que ajudam no entendimento da relação das plantas com os estresses.

## **2.5 A cultura do girassol**

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma planta originária da América do Norte, porém atualmente já é cultivada nos cinco continentes, e estima-se que a área cultivada atinja cerca de 23 milhões de hectares (LIRA *et al.*, 2011). É uma planta dicotiledônea, ordem Asterales, família Asteraceae, subfamília Asteroideae, tribo Heliantheae e gênero *Helianthus*.

Por ser uma cultura da qual se torna possível explorar quase todas as suas partes, o girassol é utilizado no mundo todo e no Brasil, para as mais diversas finalidades (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2011; TRAVASSOS *et al.*, 2012). De acordo com Nobre *et al.* (2010) dentre os usos do girassol, em função de sua versatilidade, estão a produção de forragem alternativa, uso de planta melífera e ornamental, produção de óleo para alimentação humana e biocombustíveis. No Brasil, a cultura do girassol é enquadrada como uma das mais promissoras oleaginosas fornecedoras de matéria prima para o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB).

Segundo Fonseca e Vázquez (1994), o girassol é uma espécie que possui uma elevada capacidade fotossintética e a área foliar tem singular importância para a produção. O heliotropismo apresentado pelas folhas jovens, decorrente da inclinação perpendicular em relação aos raios solares torna a intercepção solar mais eficiente. Para Shell e Lang (1976), esse movimento das folhas é capaz de elevar a taxa de fotossíntese em até 23%, e segundo Fonseca e Vázquez (1994), aumentam entre 10% e 20% a capacidade de produção.

Banys *et al.*, (1996), relatam que o girassol mesmo sendo uma espécie C3, apresenta um comportamento típico das espécies C4, por responder positivamente a elevadas temperaturas e a altas intensidades luminosas com incrementos crescentes no acúmulo de matéria seca.

O girassol é uma oleaginosa que apresenta características agronômicas importantes, tais como maior resistência à seca, ao frio e ao calor (Chambó *et al.*, 2011), não apresentando, contudo, boa tolerância à salinidade. Ressalta-se, no entanto, que existem diferenças na susceptibilidade ao estresse salino entre genótipos comerciais de girassol. Portanto, estudos de fisiologia e bioquímica em genótipos de girassol contrastantes à salinidade são relevantes, no sentido de fornecer subsídios para se conseguir plantas que sejam tolerantes ao excesso de sais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal e condições experimentais

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 da Universidade Federal do Ceará. Em um experimento realizado previamente, sementes de seis genótipos comerciais (Catissol, BRS 321, BRS 323, BRS 324, H360 e H251) de girassol (*Helianthus annuus*), obtidas da Embrapa Soja, foram submetidas à salinidade (100 mM de NaCl) durante 10 dias. Com base nos dados de massas secas, área foliar e parâmetros fotoquímicos, os genótipos com respostas mais contrastantes à salinidade foram selecionados. Assim, no experimento definitivo, sementes de dois genótipos de girassol selecionadas previamente como tolerante (BRS 321) e sensível (Catissol) à salinidade, foram esterilizadas superficialmente com NaOCl 1%, por 5 min e em seguida, lavadas com água destilada. A semeadura foi realizada em copos plásticos contendo vermiculita umedecida. Aos sete dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva de Hoagland (diluída 1:2), sob aeração constante, onde permaneceram por cinco dias, para aclimação. Após esse período, foram iniciados os tratamentos: controle (solução nutritiva) e salino (solução nutritiva + NaCl a 100 mM). A adição de NaCl foi realizada gradativamente (25 mM a cada 24 h). Diariamente, os níveis da solução nutritiva foram mantidos pela adição de água destilada e o pH monitorado, sendo mantido próximo a 5,5-6,0. As trocas de soluções, durante o experimento, foram efetuadas a cada 5 dias para evitar restrições de nutrientes. Durante o período experimental, os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar, no interior da casa de vegetação, registrados com um termohigrógrafo, foram de  $28,7 \pm 3$  °C e  $64,3 \pm 3,5$ %, respectivamente.

#### 3.2 Coleta das plantas e medidas de crescimento

As coletas foram realizadas aos 10 dias após a última aplicação do NaCl e ocorreu sempre no mesmo horário, entre 10 h e 12 h da manhã. As plantas foram separadas em folhas, caules e raízes, sendo a área foliar obtida com um medidor de área (LI-3100, Li-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). As três folhas mais jovens completamente expandidas, a partir do ápice, e

o terço distal das raízes foram retirados de cada repetição, congelados imediatamente em N<sub>2</sub> líquido e armazenados em ultrafreezer a -80 °C para posterior utilização nas análises enzimáticas, solutos orgânicos e demais análises. Parte do material vegetal, no estado fresco, foi utilizada para a determinação da atividade da redutase do nitrato *in vivo*, determinação dos pigmentos fotossintéticos e antocianinas. Outra parte do material vegetal fresco foi colocado em estufa a 60 °C até atingir massa constante. Com o material seco em estufa foram determinados os solutos inorgânicos e as análises de crescimento [matérias secas da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST)].

### 3.3 Determinação do teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) foi determinado como descrito por Catský (1960). Das primeiras folhas completamente expandidas (antes de serem congeladas), foram retirados 10 discos de 1,0 cm de diâmetro. Após pesagem e obtenção da massa fresca (MF), os discos foliares permaneceram imersos em água destilada por 3 h até atingirem a massa turgescente (MT). Em seguida, os discos foram colocados em estufa a 60 °C durante 72 h, para obtenção da massa seca (MS). Os dados obtidos foram inseridos na fórmula:  $TRA = [(MF-MS)/(MT-MS)] \times 100$ .

### 3.4 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Discos foliares (aproximadamente 0,05 g) de folhas completamente expandidas foram colocados em tubos de ensaio revestidos com papel alumínio, sendo, em seguida, adicionados a eles 2,0 mL da solução de extração (CaCO<sub>3</sub> saturado com DMSO). Os tubos foram mantidos sob escuro por 24 h e em seguida, incubados em banho-maria a 65 °C por 30 min. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro a 665, 649 e 480 nm. Os conteúdos de clorofila *a*, *b* e *total* e de carotenóides foram estimados por meio de equações específicas relatadas por Arnon (1949), através das seguintes fórmulas:  $Clf_a = 12,47_{A665} - 3,62_{A649}$ ;  $Clf_b = 25,06_{A649} - 6,50_{A665}$ ;  $Clf_{total} = 7,15_{A665} + 18,71_{A649}$  e  $Carotenóides = (1000_{A480} - 1,29 Clf_a - 53,78 Clf_b)/220$ . Os valores obtidos foram expressos em µg.g<sup>-1</sup> de matéria fresca (MF).

### 3.5 Determinação de antocianinas

Discos foliares (aproximadamente 0,1 g) de folhas completamente expandidas foram colocados em tubos de ensaio revestidos com papel alumínio, nos quais foram adicionados 5,0 mL da solução de extração, composta por ácido clorídrico, água e metanol, na proporção 1:3:16 (v:v:v). Os tubos foram fechados e mantidos a 4 °C sob agitação constante com movimentos orbitais por 48 h, sendo, em seguida, centrifugados a 3.000 x g por 20 min a 4 °C. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro a 530 e 653 nm. Os conteúdos de antocianinas foram estimados como descrito por M'rah *et al.* (2010), através da seguinte fórmula: Antocianina =  $A_{530nm} - 0,24A_{653nm}$ . Os valores obtidos foram expressos em mmol.g<sup>-1</sup> matéria fresca (MF).

### 3.6 Medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila

As trocas gasosas (fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e eficiência da carboxilação) e de fluorescência da clorofila foram determinadas no dia anterior à coleta, nas folhas completamente expandidas, com um analisador portátil de gás no infravermelho (mod. Li-6400XT, Li-COR, NE, USA) com um fluorômetro acoplado (mod. 6400-40, Li-COR, NE, USA). A intensidade luminosa utilizada nas medições de trocas gasosas foi de 1000  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , enquanto que para as medidas de fluorescência da clorofila utilizou-se 10% desse valor. Com as folhas expostas à luz, foram determinados os parâmetros da fluorescência do estado adaptado à luz: qP (“quenching” fotoquímico), NPQ (“quenching” não-fotoquímico),  $\phi\text{PSII}$  (eficiência fotoquímica do fotossistema II) e taxa de transporte de elétrons (ETR). Após as folhas estarem adaptadas a condições de escuro por 30 min, as leituras de fluorescência variável (Fv) e máxima (Fm) foram determinadas e utilizadas para o cálculo da eficiência fotoquímica potencial do PSII, expressa pela relação Fv/Fm. Para avaliação das trocas gasosas das plantas de girassol, inicialmente, foram realizadas medições de fotossíntese líquida a cada duas horas entre 7:00 h e 15:00 h, para determinar o ponto máximo de assimilação de CO<sub>2</sub> que se situa entre 10:30 h e 11:30 h, horário em que foram realizadas as medições definitivas.

### 3.7 Determinação dos teores de íons inorgânicos

Os teores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  foram determinados em folhas, na seiva do xilema e em raízes das plantas de girassol. Para a preparação dos extratos de folhas e raízes utilizou-se o método descrito por Cataldo *et al.* (1975), que constituiu na homogeneização de 50 mg da massa seca dos tecidos, previamente triturados e convertidos a pó, com 5,0 mL de água desionizada durante 1 h, em banho-maria a 40 °C. Os tubos contendo o homogenato foram agitados vigorosamente a cada 15 min e, em seguida, centrifugados a 3.000 x g por 10 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel de filtro e armazenado a -20 °C. Para a extração da seiva do xilema utilizou-se o método descrito por Scholander (1965). Após um corte transversal na base do caule, próximo às raízes, a parte aérea foi acondicionada em uma bomba de Scholander. Foi aplicada pressão na câmara até culminar na saída de gotas de seiva na superfície do corte (LIANG *et al.*, 1996). Com o auxílio de uma pipeta automática, a seiva foi coletada e congelada com  $\text{N}_2$  líquido.

Os teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama, segundo metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1989), sendo efetuada uma leitura no fotômetro de chama [Micronal<sup>®</sup>, modelo B462 (São Paulo, São Paulo, Brasil)] para cada extrato.

O  $\text{NO}_3^-$  foi determinado através do método do ácido salicílico (CATALDO *et al.*, 1975). À 100  $\mu\text{L}$  do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de ácido salicílico a 5%, em ácido sulfúrico concentrado. Depois de 20 min em repouso, foram adicionados 9,5 mL de NaOH a 2 M. Os tubos foram agitados vigorosamente e esperou-se a mistura de reação atingir a temperatura ambiente (25 °C), para então se fazer as leituras de absorvância em 410 nm. Para quantificação dos teores de  $\text{NO}_3^-$  foi feita uma curva padrão com concentração crescente de  $\text{KNO}_3$ .

Os teores de amônio livre foram determinados pelo método do fenolato-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967). Esse método é baseado na formação do indofenol, depois da reação com amônia, fenol e hipoclorito, em pH alcalino. À 400  $\mu\text{L}$  do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 2,5 mL da solução A (fenol a 5% e nitroprussiato a 0,005%, em água desionizada) e 2,5 mL da solução B (NaOH a 0,5% e hipoclorito de sódio a 0,06%, em água desionizada). Após a adição de cada solução, os tubos foram agitados vigorosamente e, em seguida, incubados a 37 °C, em banho-maria, por 20 min. Após esse processo, os tubos

ficaram em repouso por 45 min quando, então, foram feitas leituras de absorvância a 625 nm. Para quantificação dos teores de amônio foi feita uma curva padrão com concentração crescente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Com exceção das determinações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , cada repetição para determinação de íons inorgânicos constou da dosagem em duplicata de cada extrato. Os teores dos íons nas folhas e raízes foram expressos em  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de matéria seca e na seiva do xilema foram expressos em mM. Os dados obtidos representam a média de cinco repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

### **3.8 Atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio**

#### **3.8.1 Redutase do nitrato (NR) *in vivo***

A atividade da NR, *in vivo*, foi determinada como descrito por Silveira *et al.* (1998), com modificações. Esse método consiste na infiltração no tecido de uma solução contendo nitrato e na subsequente dosagem do nitrito produzido na reação, o qual se difunde no meio de incubação. Dessa maneira, para preparação dos extratos, 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 5,0 mL do meio de incubação (tampão fosfato de potássio a 0,1 mM, pH 7,5;  $\text{KNO}_3$  a 50 mM; isopropanol a 1% (v/v); cloranfenicol a 15 mg/L. Em seguida, os tubos foram fechados, envoltos em papel de alumínio e infiltrados à vácuo por 2 min, sendo o vácuo desfeito e novamente refeito, por mais 2 min. Após este processo, as amostras foram incubadas no escuro a 30 °C, em banho-maria, por 30 min. Como branco da reação foi utilizado a mesma mistura de reação, exceto que o extrato foi substituído por meio de incubação. A concentração de nitrito foi determinada colorimetricamente pela adição de 1,0 mL de sulfanilamida a 1% (p/v), preparada em HCl a 2,4 M, e 1,0 mL de N-naftil-etilenodiamina a 0,02% (p/v) a 2,0 mL do meio de incubação. Foram feitas leituras de absorvância em 540 nm e construída uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescente de  $\text{NaNO}_2$ . A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$  matéria fresca e representa a média de cinco repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

### 3.8.2 Redutase do nitrito (NiR)

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 (1,0 g) foram maceradas em almofariz, utilizando-se N<sub>2</sub> líquido e, em seguida, homogeneizadas com 2 mL do tampão de extração, composto por Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> a 10 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 homogenato foi filtrado em tela de náilon, sendo, em seguida, centrifugado a 16.000 x g, durante 25 min, a 4 °C. Os precipitados foram desprezados e os sobrenadantes submetidos a uma nova centrifugação a 16.000 x g por 15 min, a 4 °C. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C e o sobrenadante final (extrato) foi mantido em banho de gelo até sua utilização nos ensaios enzimáticos, os quais foram realizados no mesmo dia da extração.

A atividade da NiR foi determinada de acordo com o método descrito por Datta e Sharma (1999). O meio de reação (volume final de 2,0 mL) foi composto de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,5, NaNO<sub>2</sub> a 2 mM, metilviologênio a 0,25 mM e 100 µL do extrato, sendo a reação iniciada pela adição de 200 µL de ditionito de sódio a 25 mg/mL, preparado em uma solução de NaHCO<sub>3</sub> a 290 mM. Os tubos contendo o meio de reação foram incubados a 30 °C, em banho-maria, por 30 min. Após esse período, 0,1 mL do meio de reação foi adicionado a tubos de ensaio contendo 1,9 mL de água desionizada, sendo a reação parada por agitação vigorosa dos tubos, por 10 min, para oxidar o ditionito de sódio remanescente. Em seguida, determinou-se a concentração de nitrito remanescente no meio de reação, em procedimento idêntico ao descrito no item 2.8.2. Como branco da reação foi utilizado a mesma mistura de reação, exceto que o extrato foi substituído por tampão de extração. A quantidade de nitrito convertida em produto (amônio) pela NiR foi estimada subtraindo-se do branco a quantidade de nitrito no meio de reação após o final do ensaio. A absorbância foi determinada a 540 nm, tendo como base uma curva padrão, utilizando-se NaNO<sub>2</sub>. A atividade enzimática foi expressa em nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína e representa a média de cinco repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

### 3.8.3 Sintetase da glutamina (GS)

Os extratos foram preparados de acordo com o método descrito por Seebauer *et al.* (2004), com modificações. Amostras de 1,0 g de folhas ou raízes congeladas foram maceradas em almofariz, utilizando-se N<sub>2</sub> líquido e, em seguida, homogeneizadas com 1,5 mL de tampão imidazol a 50 mM, pH 7,2, contendo MgSO<sub>4</sub> a 20 mM, EDTA a 1mM, DTT a 5 mM, PVP a 1% (p/v) e β-mercaptoetanol a 1% (v/v). O homogenato foi filtrado em tela de náilon, sendo, em seguida, centrifugado a 10.000 x 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 de extração foi realizado a 4 °C.

A atividade da GS foi determinada de acordo com o método descrito por Rhodes *et al.* (1975), através da formação de γ-glutamil hidroxamato (atividade “sintetase”) a partir do glutamato e hidroxilamina, sendo esta em substituição ao amônio, o substrato fisiológico. O meio de reação (volume final de 1,0 mL) consistiu de tampão imidazol a 100 mM, pH 7,2, glutamato a 80 mM (neutralizado com imidazol), ATP a 20 mM, MgCl<sub>2</sub> a 50 mM e 200 µL do extrato, sendo a reação iniciada pela adição de 50 µL de hidroxilamina a 25 mM. Os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados a 30 °C, em banho-maria, por 25 min. Após esse período, a reação enzimática foi parada pela adição de 1,0 mL de uma solução contendo FeCl<sub>3</sub> a 0,37 M, HCl a 0,67 N e ácido tricloracético (TCA) a 0,2 M. Estabelecida a cor da reação (após cerca de 10 min), as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 min. A quantidade de γ-glutamil hidroxamato formada foi determinada colorimetricamente pela leitura em 540 nm, tendo como base uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de γ-glutamil monohidroxamato (GMH). O branco da reação constou da mesma mistura de reação, exceto que ao invés do extrato, foram adicionados 200 µL do tampão de extração. Os resultados foram expressos em nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína e representam a média de cinco repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

### 3.8.4 Sintase do glutamato (GOGAT)

Os extratos para esta análise foram os mesmos utilizados para a atividade da NiR. A atividade da enzima GOGAT foi mensurada de acordo com o método de Nemat-Alla *et al.*

(2008), por meio da quantificação do NADH oxidado. A mistura de reação (volume final de 2,0 ml) foi composta de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,5, NADH a 1,5 mM, glutamina a 10 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato a 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 150  $\mu$ L do extrato e acompanhada diretamente no espectrofotômetro pela redução da absorbância a 340 nm. A atividade foi calculada pela taxa de oxidação do NADH que foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o NADH. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína e representam a média de cinco repetições, sendo cada amostra dosada em duplicata.

### **3.9 Determinação dos teores de proteínas**

O método de Bradford (1976) foi empregado para determinar a concentração de proteínas nos extratos e que foi utilizada para as determinações das atividades enzimáticas. A 100  $\mu$ L do extrato, convenientemente diluído, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de Coomassie Blue G-250 a 0,001% contendo etanol a 4,75% e ácido fosfórico a 8,5%. A mistura foi deixada em repouso por 15 min e em seguida, submetida a leituras de absorbância a 595 nm. Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizada como padrão na curva de calibração.

### **3.10 Determinação dos teores de N-aminossolúveis**

Os extratos para esta análise foram os mesmos utilizados para a determinação dos aminoácidos. 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 diluídos, 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, em metilcelosolve 100% e 0,1 mL de ninhidrina a 5%, em metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a 95 °C durante 2 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo (4 °C). Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 0,65 mL de etanol a 60%. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorbância a 570 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações

crecentes de glicina. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol. g}^{-1}$  MS e representam a média de cinco repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

### 3.11 Determinação dos teores de aminoácidos livres

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 e raízes foram homogeneizadas com 1,0 mL da mistura extratora, composta por metanol, clorofórmio e água ultrapura Milli-Q<sup>®</sup>, na proporção 12:5:3 (v:v:v), em almofariz previamente resfriado com nitrogênio líquido. O homogenato foi centrifugado a  $16.000 \times g$ , a 4 °C, durante 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspendido novamente em 1,0 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<sup>®</sup> 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 1,0 mL de seu volume. Ao final do processo, as amostras foram filtradas por meio de membrana de politetrafluoretileno (PTFE), com poro de 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

A separação e a análise dos aminoácidos foram realizadas 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 a vácuo em filtro Millipore<sup>®</sup>, por meio de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  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<sup>®</sup>; pH ajustado com NaOH a 2 N) e filtrado através de membrana de PTFE com poro de 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. No momento do uso,

5,0  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol foram adicionados a cada 625  $\mu\text{L}$  dessa mistura. Para a derivatização, 300  $\mu\text{L}$  do reagente OPA + mercaptoetanol foram adicionados a 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  foi injetada no HPLC (Sistema HPLC, Shimadzu, Japão), através do seu injetor automático (mod. SIL-20A, Shimadzu). Nesse momento foi iniciada a eluição da solução através da coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Hypersil ODS, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, Thermo Scientific), a 30 °C, com fluxo de 0,8 mL/min, através de um gradiente com 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 integração da área dos picos e comparadas a partir de uma curva padrão previamente preparada, utilizando reagentes ultrapuros (Sigma). Os resultados dos teores de cada aminoácido foram expressos em  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS.

### **3.12 Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado com um arranjo fatorial 2 x 2, constando de dois genótipos de girassol (Catissol e BRS321) e duas condições de crescimento das plantas [em ausência de NaCl (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse salino)], com cinco repetições. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão das repetições de cada tratamento. Os dados foram examinados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey, com nível de significância a 5%, foi utilizado para comparar as médias entre os tratamentos controle e salino e entre os genótipos em condições controle e de salinidade. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o Sisvar<sup>®</sup> 5.3 e para a confecção dos gráficos foi o SigmaPlot<sup>®</sup> 11.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Crescimento vegetativo

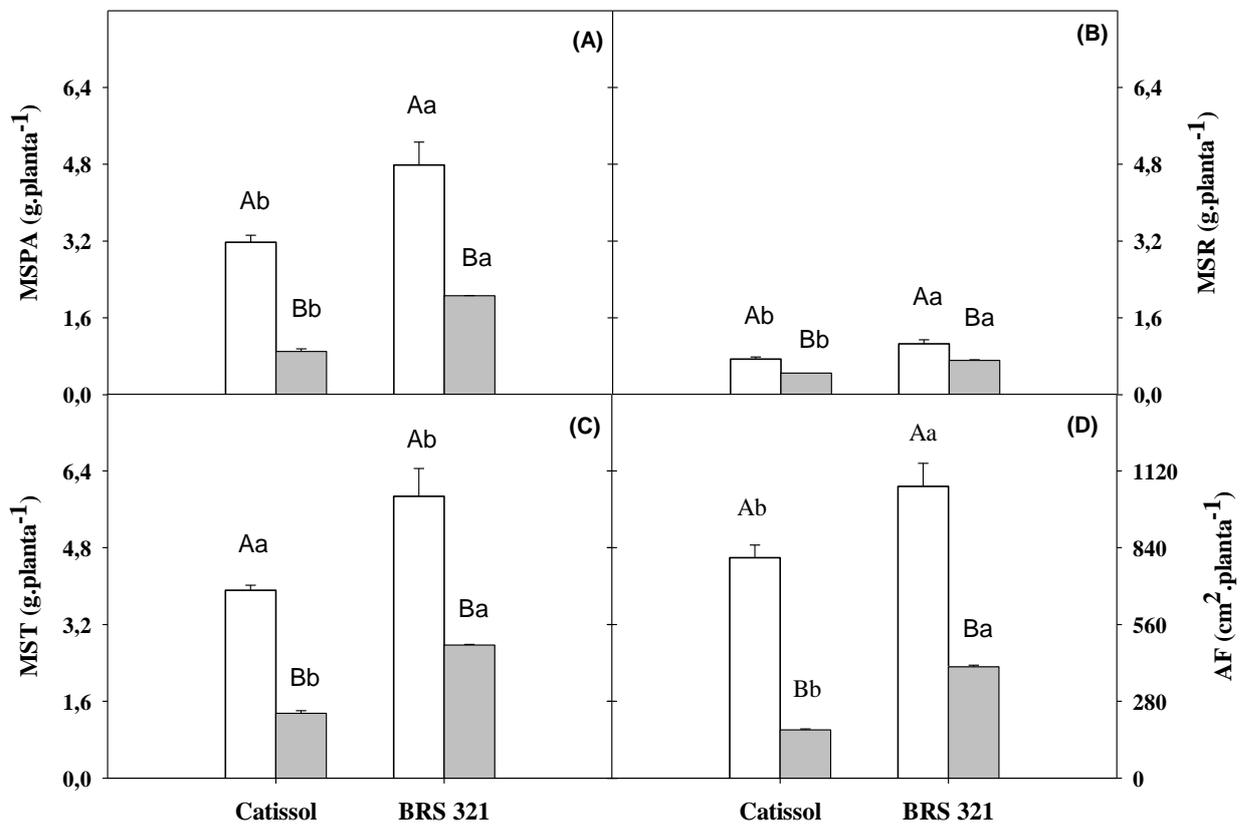
Tanto em condições controle (ausência de NaCl) como em condições de estresse salino (NaCl a 100 mM), plantas do genótipo BRS 321 apresentaram massas secas da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST) e área foliar (AF) superiores àquelas do genótipo Catissol (Figura 1). O estresse salino limitou severamente o crescimento das plantas de girassol, sendo os efeitos mais pronunciados no genótipo Catissol. Sob condições de estresse salino, esse genótipo apresentou redução da MSPA de 72% em relação ao controle, enquanto que no genótipo BRS 321 essa redução foi de 57% (Figura 1A). Em relação à MSR, a salinidade promoveu reduções de 39% e 33%, respectivamente, nos genótipos Catissol e BRS 321, quando comparadas aos controles (Figura 1B). A MST das plantas de ambos os genótipos foi significativamente reduzida pela salinidade, sendo registrados decréscimos de 65% para o Catissol e 53% para o BRS 321 (Figura 1C). Além disso, a área foliar das plantas submetidas ao estresse salino sofreu reduções de 78% no genótipo Catissol e 62% no genótipo BRS 321, quando comparadas aos controles (Figura 1D). Vale ressaltar que, sob condições de salinidade, os valores de MSPA, MSR, MST e AF das plantas do genótipo BRS 321 foram 129, 58, 105 e 131%, respectivamente, maiores que os do genótipo Catissol.

### 4.2 Teor relativo de água

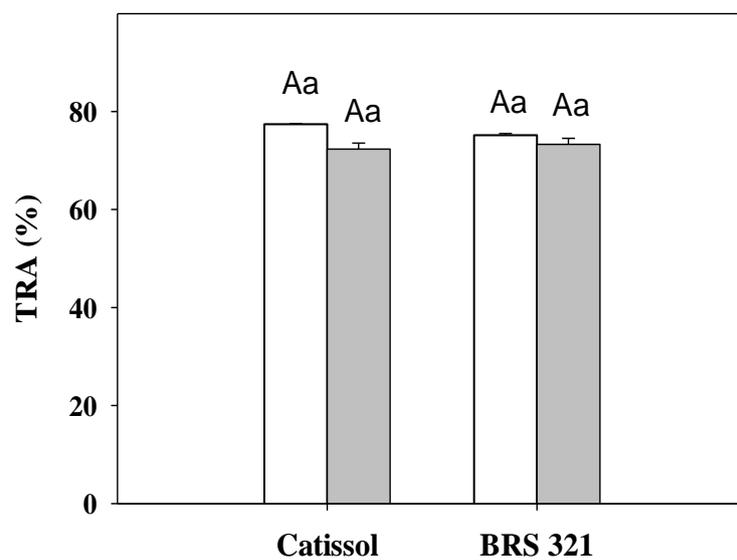
No presente estudo, o teor relativo de água (TRA) foliar não sofreu alterações significativas em função da salinidade em ambos os genótipos estudados (Figura 2).

### 4.3 Pigmentos fotossintéticos e antocianinas

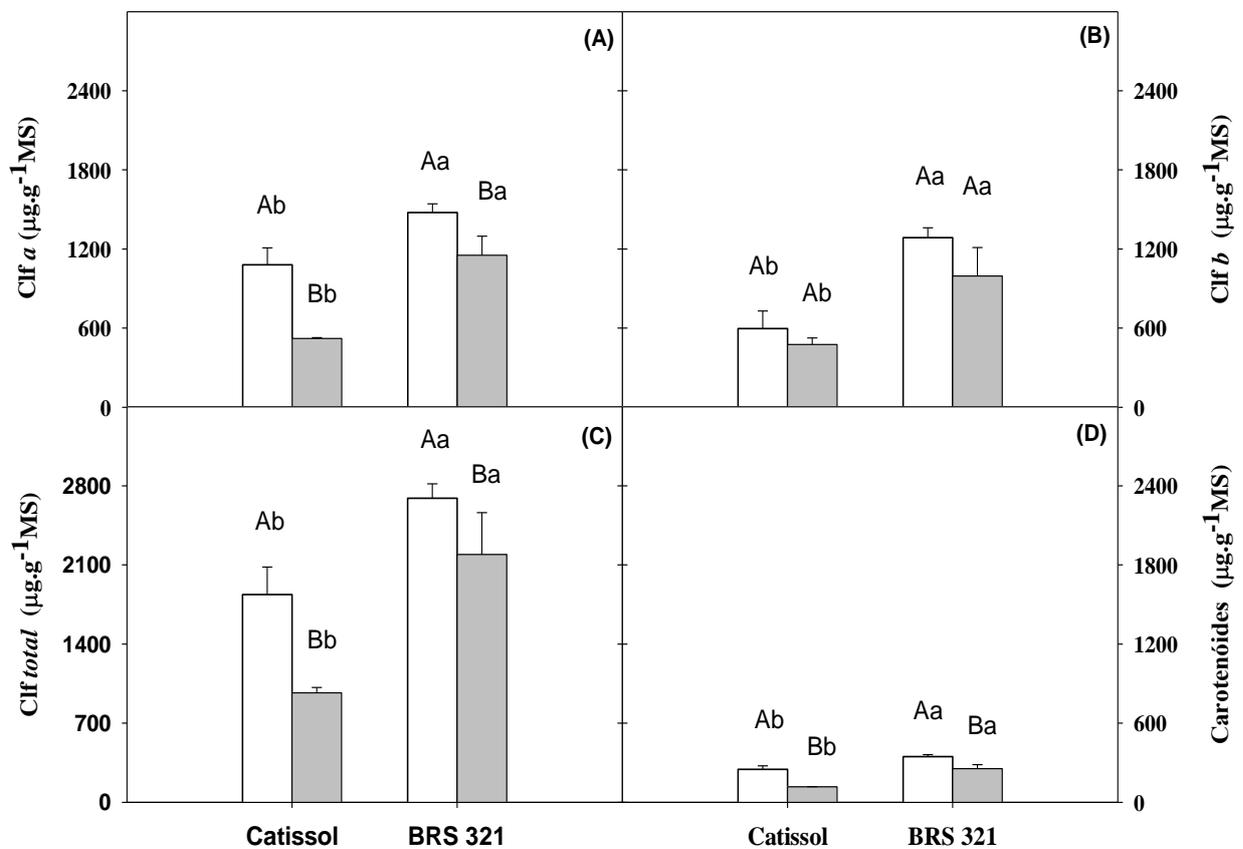
Os teores de clorofila *a* (Clf *a*), *b* (Clf *b*) e *total* (Clf *total*) e carotenóides foram maiores nas plantas do genótipo BRS 321, tanto em condições controle como de salinidade (Figura 3). O estresse salino reduziu significativamente os teores dos pigmentos fotossintetizantes em todos os genótipos analisados, com exceção da Clf *b*, em que foram observado valores similares àquelas dos controles. As reduções nos teores de Clf *a*, Clf *total* e de carotenóides pela salinidade foram de 52, 47 e 53 % no Catissol e 22, 19 e 26 % no BRS 321 (Figura 3). Além



**Figura 1.** Massas secas da parte aérea (MSPA, A), das raízes (MSR, B) e total (MST, C) e área foliar (D) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 2.** Teor relativo de água (TRA) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão



**Figura 3.** Teores de clorofila *a* (Clf *a*, A), clorofila *b* (Clf *b*, B), clorofila total (Clf total, C) e de carotenóides (D) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

disso, na presença de NaCl, os teores de Clf *a* e *total* e carotenóides das plantas do genótipo BRS 321 foram 121, 126 e 118%, respectivamente, maiores que os de plantas do genótipo Catissol.

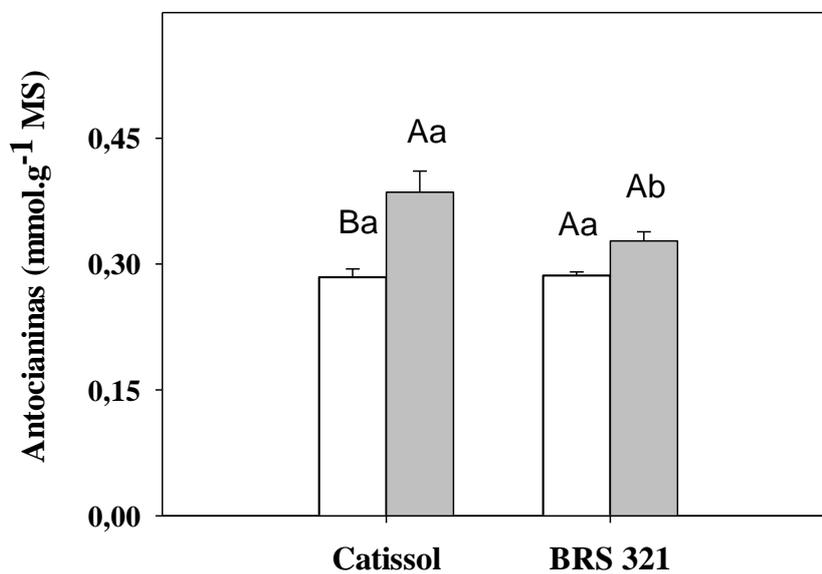
Sob condições controle, não foi observada diferença nos teores de antocianinas entre os genótipos estudados. Contudo, os teores de antocianinas das plantas estressadas do BRS 321 foram menores que aqueles das plantas do genótipo Catissol. Já na presença de salinidade, os teores de antocianinas do genótipo Catissol apresentaram incrementos de 36% em relação ao controle, enquanto que não houve alterações significativas no BRS 321 (Figura 4).

#### **4.4 Trocas gasosas**

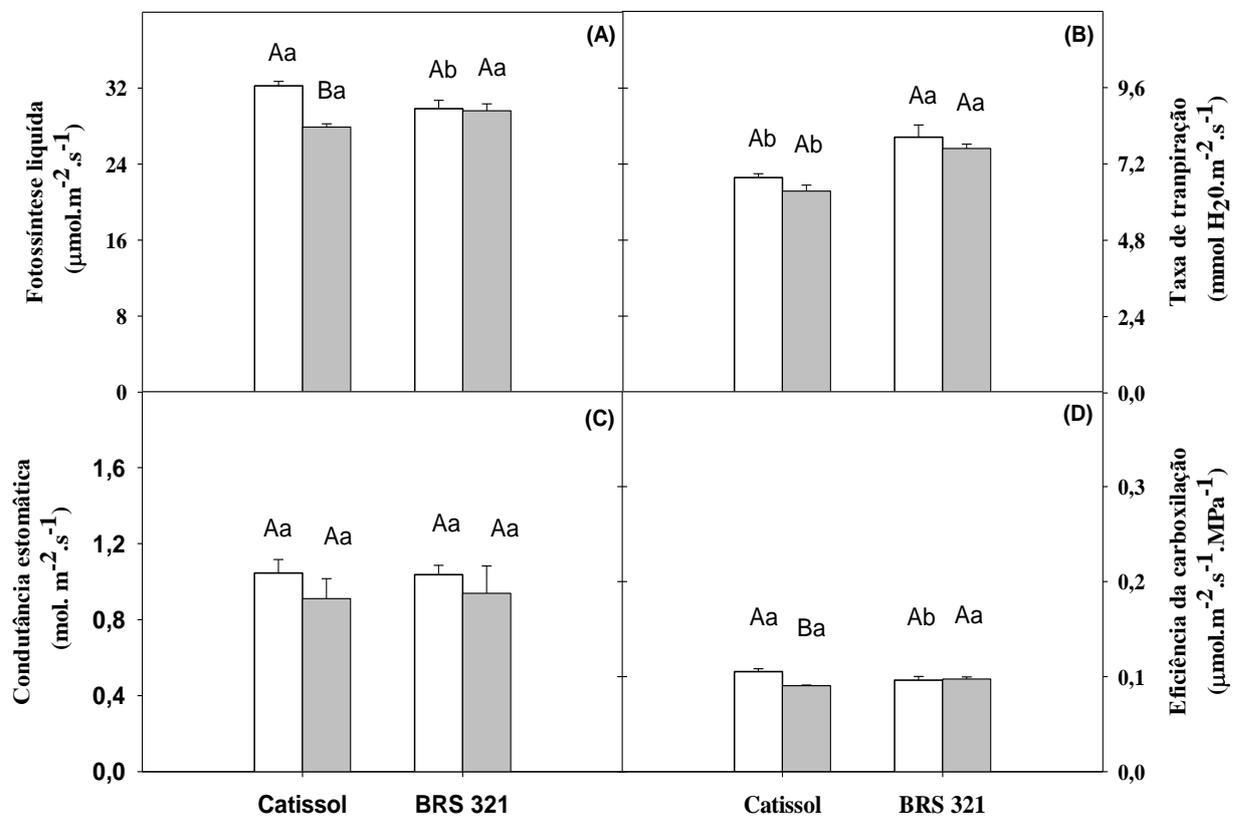
Sob condições controle, a fotossíntese líquida das plantas do genótipo Catissol foi superior a do genótipo BRS 321, sendo esses valores semelhantes nas plantas estressadas. O estresse salino reduziu significativamente a taxa fotossintética das plantas do genótipo Catissol, enquanto que não foram registradas alterações significativas no genótipo BRS 321 (Figura 5A). Por outro lado, a taxa de transpiração das plantas do genótipo BRS 321 foi maior que aquela do genótipo Catissol, tanto em condições controle como de salinidade (Figura 5B). Não foram observadas alterações significativas na condutância estomática e na transpiração em função do estresse salino, em ambos os genótipos avaliados (Figura 5B, C). Na ausência de estresse, a eficiência de carboxilação, expressa pela relação entre a fotossíntese líquida e a concentração interna de CO<sub>2</sub>, das plantas do genótipo Catissol foi superior àquela do genótipo BRS 321. No entanto, a salinidade reduziu em cerca de 14 % essa variável das plantas do genótipo Catissol, enquanto que não foram registradas alterações significativas no genótipo BRS 321 (Figura 5D).

#### **4.5 Fluorescência da clorofila**

Sob condições de salinidade, a eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II ( $\phi$ PSII) foi reduzida significativamente nas plantas do genótipo Catissol, enquanto que houve incremento dessa eficiência no genótipo BRS 321, quando comparado ao respectivo controle. Em relação à eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), não houve qualquer



**Figura 4.** Teores de antocianinas de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 5.** Fotossíntese líquida (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência da carboxilação (A/Ci, D) medidas entre 10:30 h e 11:30 h, no dia anterior à coleta, de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, ) e com NaCl a 100 mM (estresse, ). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

diferença significativa entre as plantas de ambos os genótipos, independente das condições impostas. Na ausência de NaCl, plantas do genótipo BRS 321 apresentaram *quenching* não fotoquímico (NPQ) de dissipação de energia superiores àqueles do genótipo Catissol. Quando expostos à salinidade, plantas do genótipo Catissol apresentaram incrementos de 25% no NPQ em relação ao controle, enquanto que as do genótipo BRS 321 não apresentaram alterações significativas nesse parâmetro. Alterações significativas no *quenching* fotoquímico (qP) de dissipação de energia entre os genótipos foram observadas somente na ausência de estresse, em que plantas do genótipo BRS 321 apresentaram valores menores que as do Catissol. Na ausência de NaCl, plantas do genótipo Catissol apresentaram taxa de transporte de elétrons (ETR) superiores àquelas do genótipo BRS 321; Porém quando submetidos à salinidade, plantas do genótipo BRS 321 apresentaram aumentos na ETR, enquanto que as do genótipo Catissol mostraram reduções, em relação aos respectivos controles.

**Tabela 1.** Eficiência efetiva do fotossistema II ( $\Phi$  PSII), eficiência máxima do fotossistema II (Fv/Fm), “quenching” não-fotoquímico (NPQ), “quenching” fotoquímico (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, após 10 dias de estresse salino com NaCl a 0 (controle) e 100 mM (estresse). Em um mesmo genótipo, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, enquanto que, em um mesmo tratamento, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam a média de cinco repetições  $\pm$  erro padrão.

| Genótipo | Condição | Parâmetros Fotoquímicos |                   |                   |                   |  |
|----------|----------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
|          |          | $\Phi$ PSII             | Fv/Fm             | NPQ               | qP                | ETR<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) |
| Catissol | Controle | 0,50 $\pm$ 0,01Aa       | 0,76 $\pm$ 0,01Aa | 0,78 $\pm$ 0,03Bb | 0,66 $\pm$ 0,01Aa | 209,98 $\pm$ 3,12Aa  |
|          | Estresse | 0,47 $\pm$ 0,01Ba       | 0,75 $\pm$ 0,01Aa | 0,98 $\pm$ 0,08Aa | 0,64 $\pm$ 0,01Aa | 199,47 $\pm$ 3,28Ba  |
| BRS 321  | Controle | 0,47 $\pm$ 0,00Bb       | 0,75 $\pm$ 0,00Aa | 1,00 $\pm$ 0,05Aa | 0,62 $\pm$ 0,00Ab | 195,32 $\pm$ 1,91Bb  |
|          | Estresse | 0,49 $\pm$ 0,01Aa       | 0,75 $\pm$ 0,00Aa | 0,92 $\pm$ 0,03Aa | 0,66 $\pm$ 0,01Aa | 207,83 $\pm$ 3,48Aa  |

#### 4.6 Teores de íons

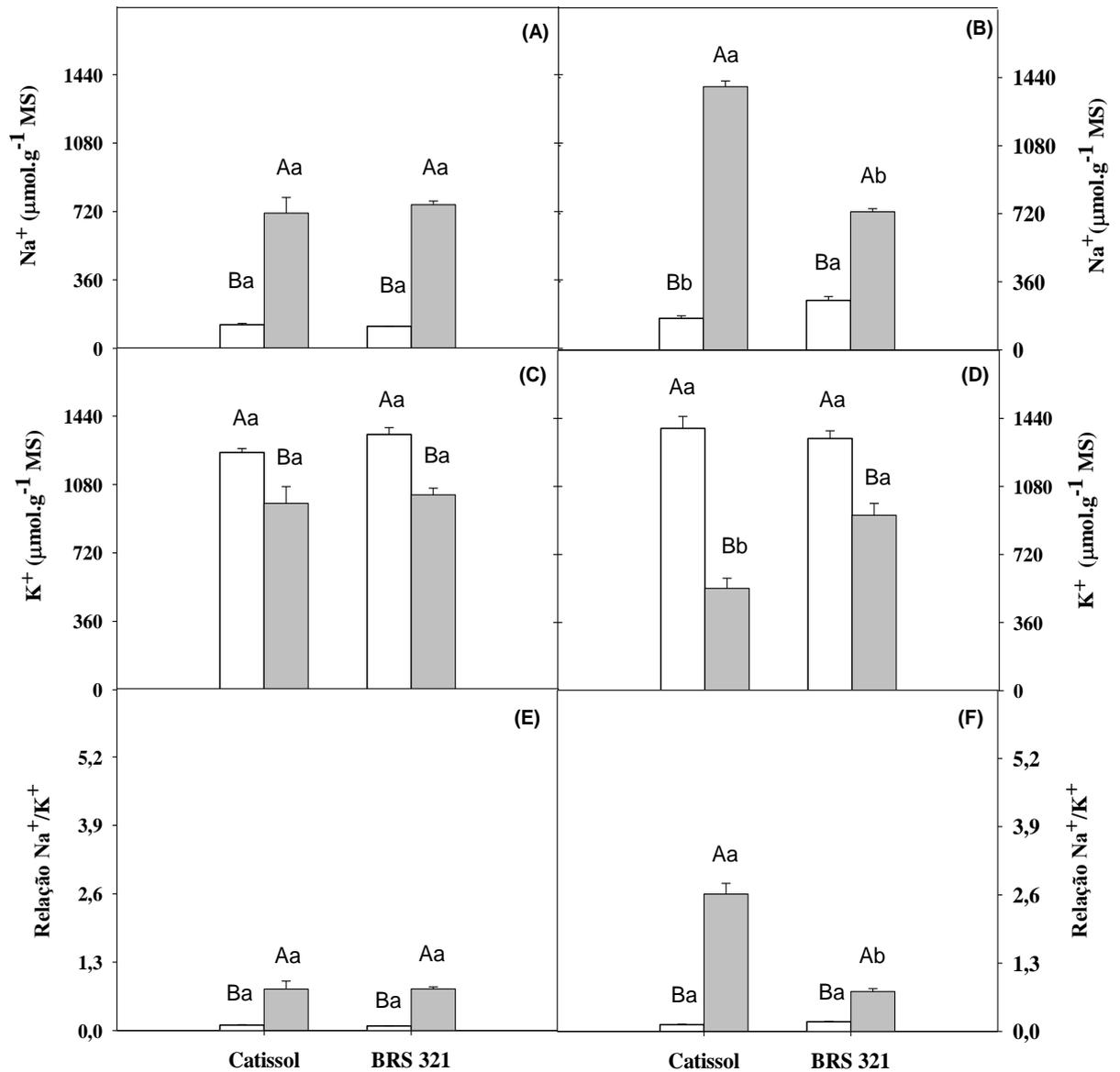
De modo geral, sob condições controle, os teores de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> apresentaram valores semelhantes nas folhas e raízes dos dois genótipos estudados, exceto para os teores de Na<sup>+</sup> das

raízes do Catissol, que foram inferiores aos do BRS 321 (Figura 6A, B, C). Com a salinidade, os teores de  $\text{Na}^+$  das folhas de ambos os genótipos foram similarmente aumentados, sendo o valor médio nas condições de estresse salino 513% superior aos dos controles (Figura 6A). Nas raízes, o acúmulo de  $\text{Na}^+$  foi mais proeminente nas plantas do genótipo Catissol, com valores 735% maiores que o controle, enquanto que no BRS 321 foram registrados teores de  $\text{Na}^+$  179% superiores ao do controle. Adicionalmente, em termos absolutos, o acúmulo de  $\text{Na}^+$  nas raízes das plantas estressadas do genótipo Catissol foi 91% maior que o do genótipo BRS 321 (Figura 6B).

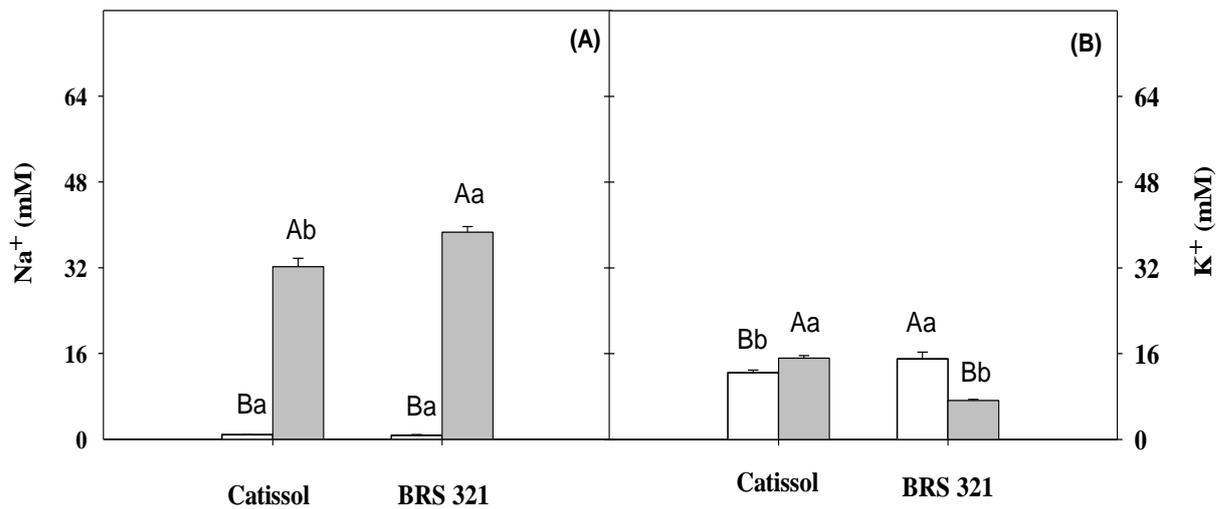
Em condições salinas, os teores de  $\text{K}^+$  das folhas dos dois genótipos analisados apresentaram reduções semelhantes, em média de 23%, quando comparados aos dos controles (Figura 6C). Nas raízes, os teores de  $\text{K}^+$  no genótipo Catissol foram fortemente reduzidos pelo estresse salino (61% de redução), enquanto que no BRS 321 essa redução foi de 30% (Figura 6D), fazendo com que este último genótipo em condições salinas acumulasse cerca de 72% de  $\text{K}^+$  a mais que o genótipo Catissol. A relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de folhas em ambos os genótipos foi significativamente aumentada pelo estresse salino (Figura 6E). Nas raízes, sob salinidade, a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foi mais proeminente no genótipo Catissol, com valor cerca de 244% maior do que o genótipo BRS 321 (Figura 6F).

No presente estudo, o carregamento no xilema, em termos de concentração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , foi regulado diferencialmente entre os genótipos de girassol estudados (Figura 7). Sob condições salinas, a concentração de  $\text{Na}^+$  foi fortemente aumentada em ambos os genótipos (36 vezes no Catissol e 52 vezes no BRS 321), sendo que o BRS 321 apresentou concentrações de  $\text{Na}^+$ , no xilema, 20% maiores que o genótipo Catissol. Na ausência de estresse, a concentração de  $\text{K}^+$  na seiva do xilema das plantas do genótipo BRS 321 foi superior ao de plantas do Catissol. Já sob estresse salino, plantas do genótipo Catissol apresentaram incremento de 22% na concentração de  $\text{K}^+$ , ao passo que as do genótipo BRS 321 mostraram redução de 52%, quando comparado aos respectivos controles.

Em condições controle, não foram observadas alterações significativas nos teores de  $\text{NO}_3^-$  entre os genótipos estudados, tanto nas folhas como nas raízes. O estresse salino reduziu drasticamente os teores de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas, sendo os maiores decréscimos observados no genótipo BRS 321 (Figura 8A). Nas raízes, embora não tenham ocorrido variações significativas pela salinidade, os teores de  $\text{NO}_3^-$  das plantas estressadas do genótipo BRS 321



**Figura 6.** Teores de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e relação Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> em folhas (A e C) e raízes (B e D) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, ) e com NaCl a 100 mM (estresse, ). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 7.** Concentrações de sódio (Na<sup>+</sup>, A) e potássio (K<sup>+</sup>, B) na seiva do xilema de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, ) e com NaCl a 100 mM (estresse, ). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

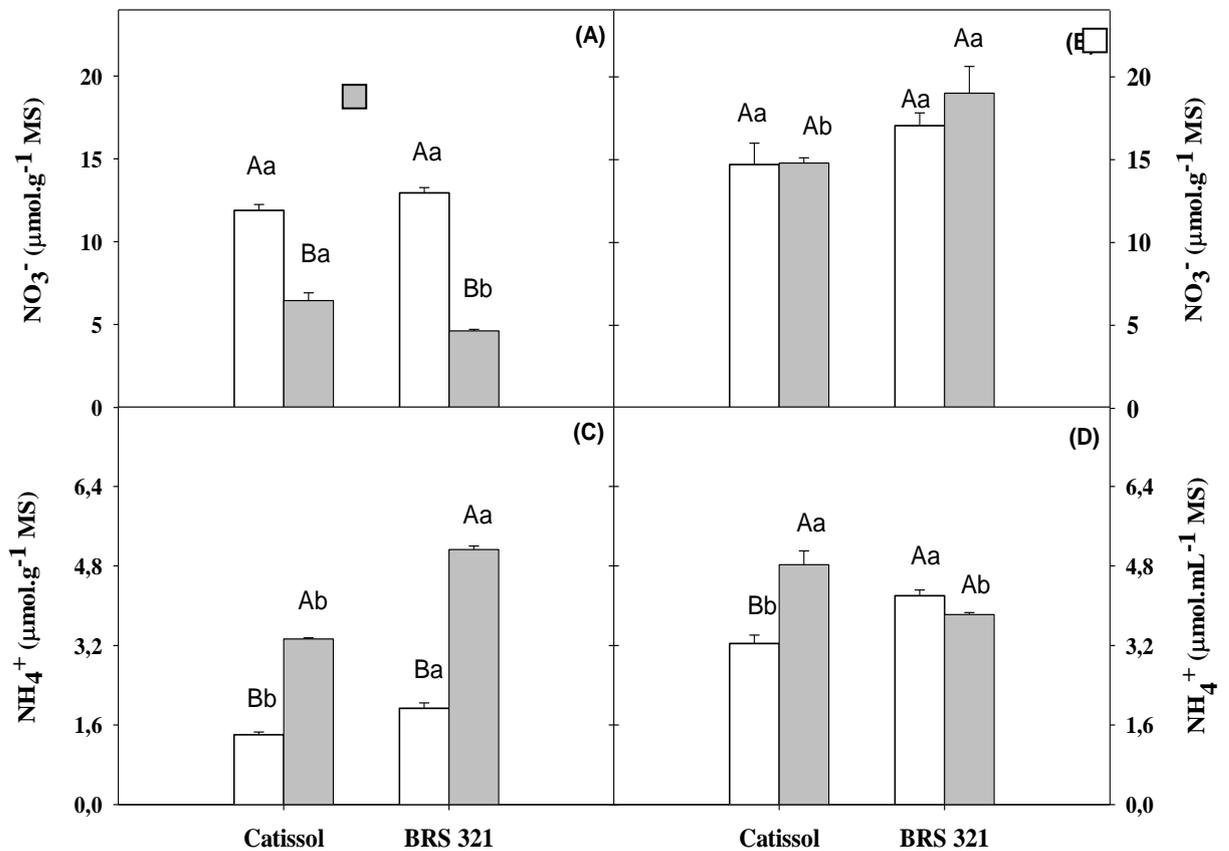
foram superiores (30% de aumento) àqueles de plantas do genótipo Catissol (Figura 8B). Além disso, em termos absolutos, os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram mais elevados nas raízes do que nas folhas, principalmente em condições salinas.

De modo geral, independente das condições impostas, os teores de  $\text{NH}_4^+$  foram maiores nos tecidos das plantas do genótipo BRS 321, exceto para as raízes submetidas ao salino (Figura 8C, D). O estresse salino aumentou significativamente os teores desse íon nos órgãos de ambos os genótipos, com exceção das raízes do genótipo BRS 321, que apresentaram teores de  $\text{NH}_4^+$  similares ao controle.

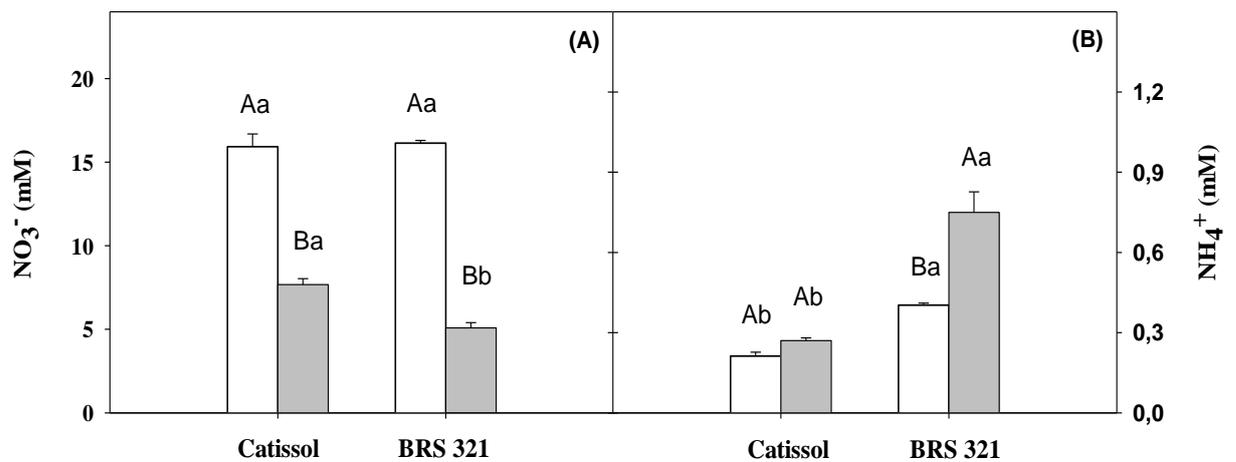
Na ausência de salinidade, os teores de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema foram similares em ambos os genótipos avaliados (Figura 9A). O estresse salino reduziu severamente o teor de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema, sendo os efeitos mais conspícuos nas plantas do genótipo BRS 321. Por outro lado, o teor de  $\text{NH}_4^+$  na seiva do xilema foi maior nas plantas do genótipo BRS 321, tanto em condições controle como de estresse salino (Figura 9B). Sob salinidade, plantas desse genótipo apresentaram incrementos de 86% nos teores de  $\text{NH}_4^+$  no xilema, em relação ao controle, enquanto não houve mudança do genótipo Catissol. Além disso, os teores de  $\text{NH}_4^+$  das plantas estressadas do genótipo BRS 321 foram 178% superiores às do genótipo Catissol, nessas mesmas condições (Figura 9B). Além disso, os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram, em média, 51 e 11 vezes mais elevados que os de  $\text{NH}_4^+$ , em condições controle e estresse, respectivamente.

#### **4.7 Assimilação do nitrogênio**

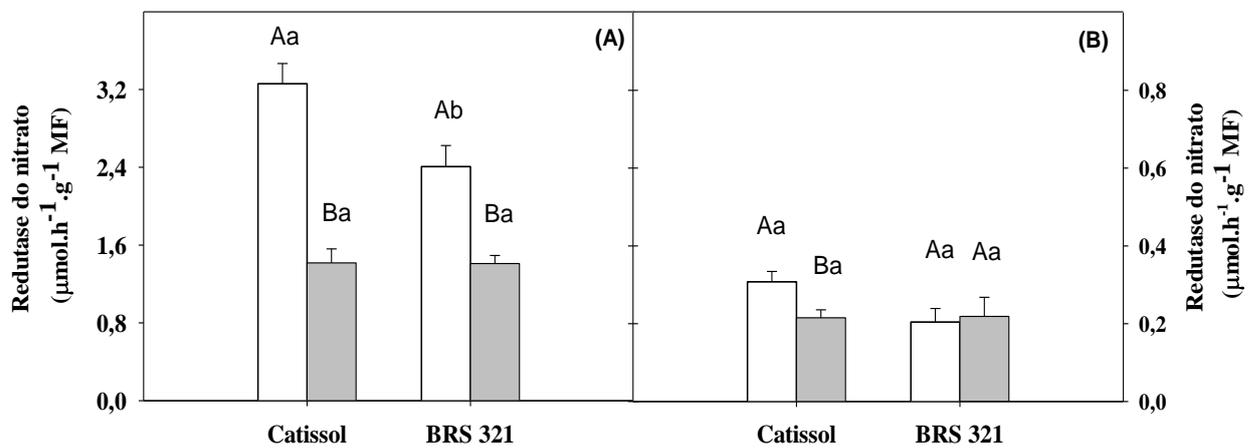
Em condições controle, a atividade da NR das folhas foi maior no genótipo Catissol em relação ao BRS 321 (Figura 10A). O estresse salino afetou consideravelmente a atividade dessa enzima, com reduções de 57 e 41%, respectivamente, nos genótipos Catissol e BRS 321, quando comparados aos respectivos controles. Por outro lado, nas raízes, não foram observadas variações significativas na atividade da NR, independente das condições impostas e do genótipo estudado (Figura 10B). Vale ressaltar que, em termos absolutos, a atividade da NR foi maior NR foi maior nas folhas do que nas raízes (10 e 5 vezes nas condições controle e estresse, respectivamente).



**Figura 8.** Teores de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em folhas (A e C) e raízes (B e D) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle,  $\square$ ) e com NaCl a 100 mM (estresse,  $\blacksquare$ ). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 9.** Teores de  $\text{NO}_3^-$  (A) e  $\text{NH}_4^+$  na seiva do xilema (B) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 10.** Atividade da redutase do nitrato em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

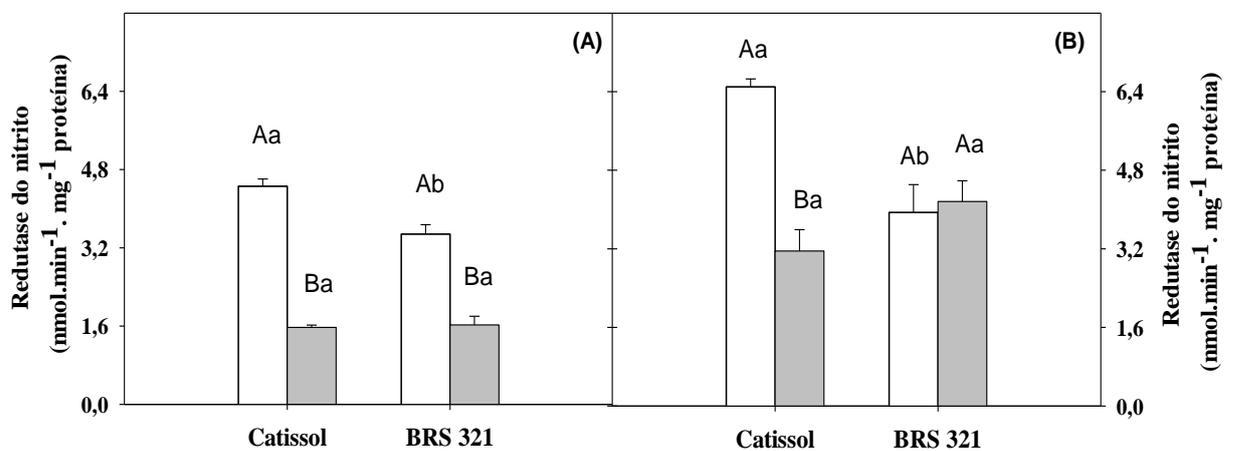
A atividade da redutase do nitrito (do inglês, *Nitrite Reductase*, NiR) foi alterada diferencialmente entre os genótipos e condições analisadas (Figura 11). Sob condições controle, a atividade da NiR das folhas das plantas do genótipo Catissol foi superior àquela do genótipo BRS 321. O estresse salino promoveu reduções drásticas na atividade da NiR das folhas, sendo observadas reduções de 53 e 65% respectivamente nos genótipos BRS 321 e Catissol, quando comparada aos controles (Figura 11A). Nas raízes, alterações significativas na atividade da NiR pela salinidade foram observadas somente no genótipo Catissol, com decréscimos de 50% em relação ao controle (Figura 11B).

Nas folhas, a atividade da sintetase da glutamina (do inglês, *Glutamine Synthetase*, GS) foi maior nas plantas de girassol do genótipo BRS 321, tanto em condições controle como de salinidade (Figura 12A). O estresse salino aumentou consideravelmente a atividade da GS, sendo os efeitos mais pronunciados no genótipo BRS 321. Na exposição ao NaCl, plantas desse genótipo apresentaram valores de atividade da GS 269% maiores que às do genótipo Catissol (Figura 12A). Em contraste, nas raízes, alterações na atividade da GS, pela salinidade, foram registradas somente no genótipo BRS 321, com redução de 65% em relação ao controle (Figura 12B).

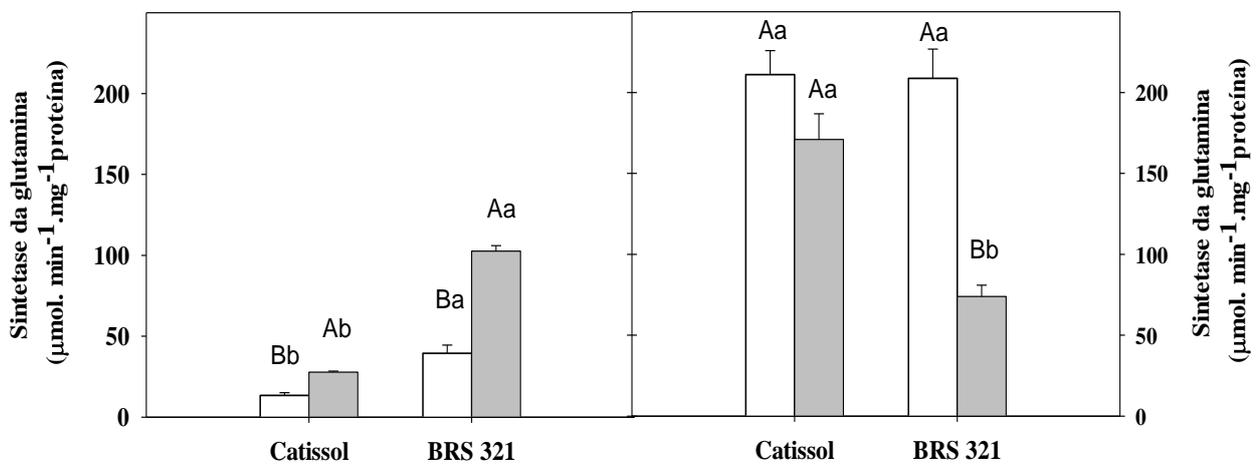
Sob condições controle, plantas do genótipo Catissol mostraram atividade da sintase do glutamato (do inglês, *Glutamine 2-oxoglutarate Aminotransferase*, GOGAT) nas folhas superiores àquelas do BRS 321 (Figura 13A), enquanto nas raízes, nessas mesmas condições, a atividade dessa enzima foi a mesma nos dois genótipos. Por outro lado, quando expostas a 100 mM de NaCl, plantas do Catissol apresentaram reduções significativas na atividade da GOGAT em ambos os órgãos, sendo os maiores decréscimos registrados nas raízes, com valor 69% inferior ao do controle (Figura 13B). Vale ressaltar que, em termos absolutos, os níveis de atividade dessa enzima foram maiores nas raízes em comparação as folhas.

#### **4.8 N-aminossolúveis**

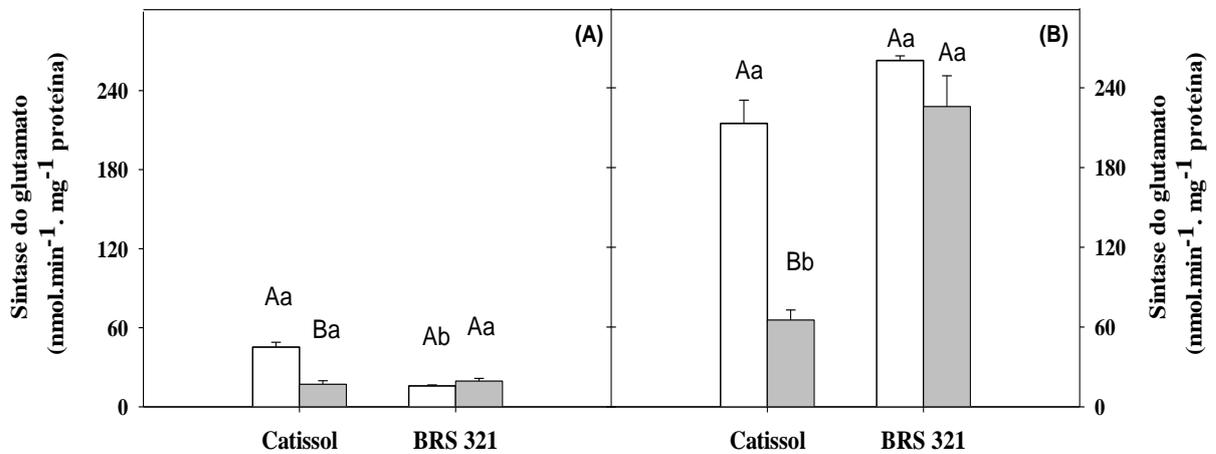
Na ausência de estresse, os teores de N-aminossolúveis foram maiores nas plantas do genótipo Catissol, tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 14). A salinidade aumentou os teores desses solutos orgânicos nas folhas dos dois genótipos, sendo os aumentos de 14% e 128%, respectivamente, nos genótipos Catissol e BRS 321. Assim, as plantas do BRS 321



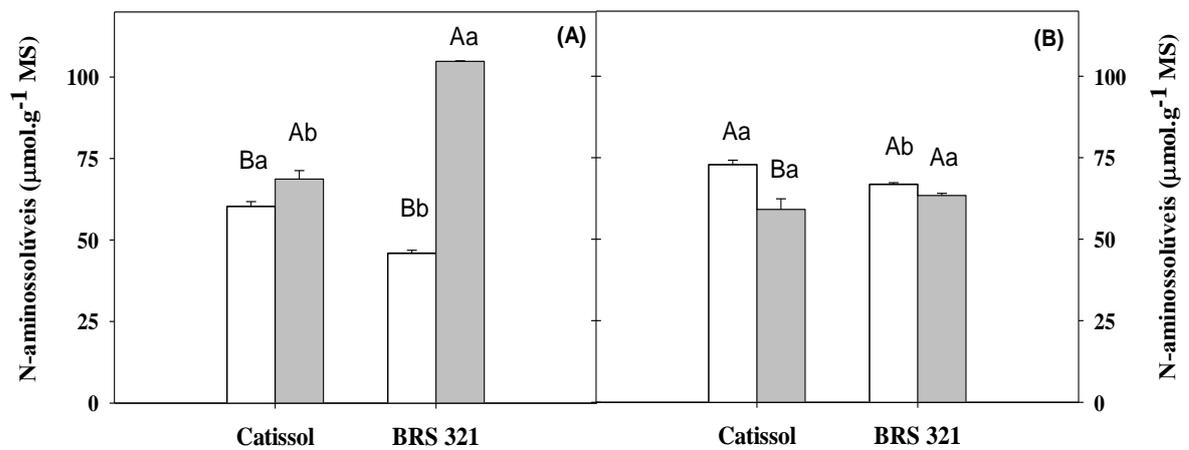
**Figura 11.** Atividade da redutase do nitrito em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 12.** Atividade da sintetase da glutamina em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 13.** Atividade da sintase do glutamato em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 14.** Teores de N-aminossolúveis em folhas (A) e raízes (B) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

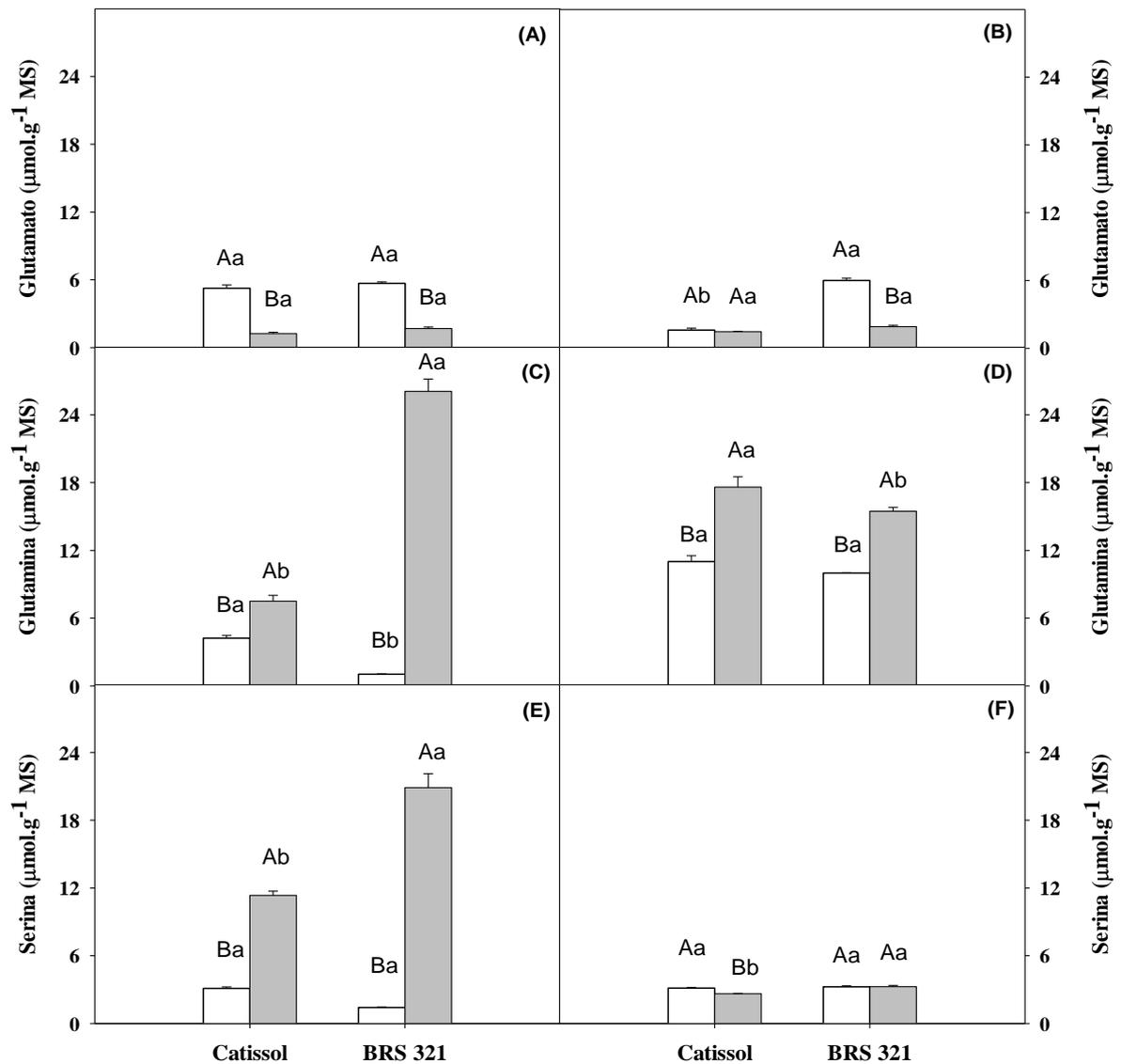
apresentaram 53% mais N-aminossolúveis que às do Catissol (Figura 14A). Em contraste, o estresse salino promoveu redução nos teores de N-aminossolúveis nas raízes do genótipo Catissol, não tendo sido registrada diferença significativa entre as condições de estresse salino dos dois genótipos avaliados (Figura 14B).

#### 4.9 Aminoácidos livres

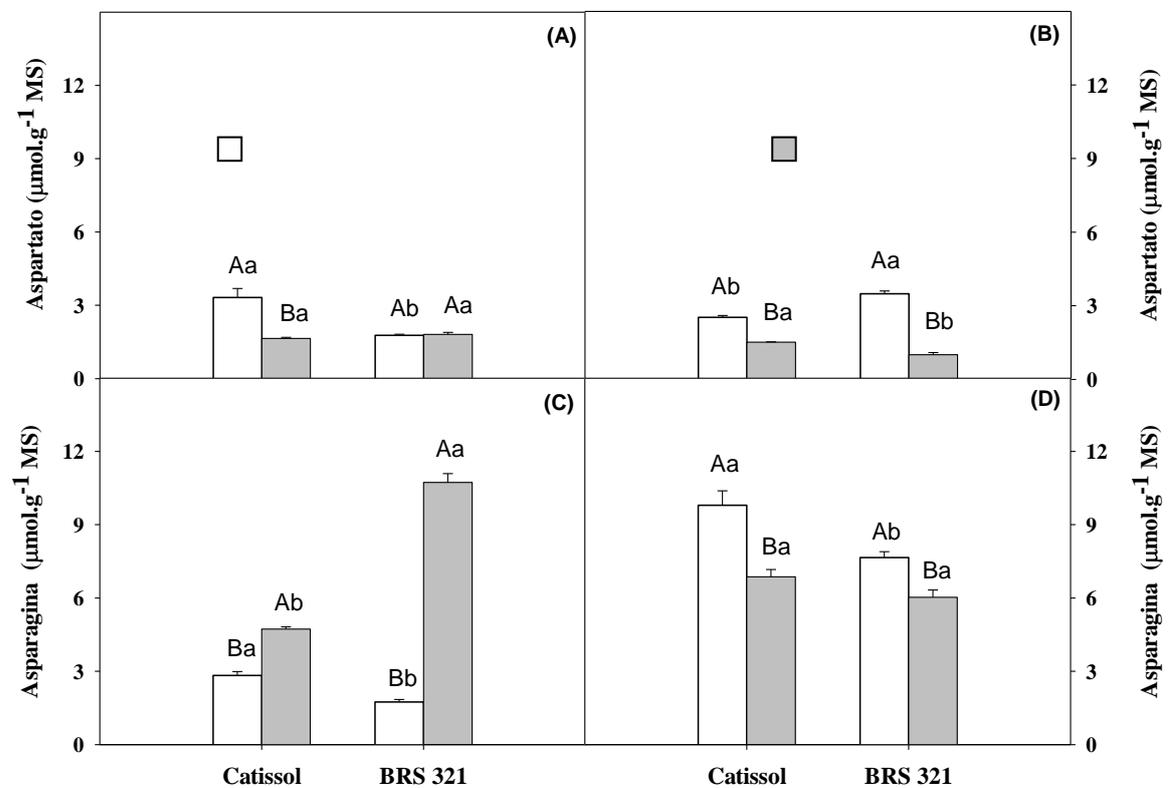
Na ausência de salinidade, folhas de ambos os genótipos apresentaram teores de glutamato similares, no entanto, nas raízes, o genótipo BRS 321 apresentou valores 3 vezes superiores ao Catissol (Figura 15A). O estresse salino promoveu redução, em média, de 71% nos teores de glutamato das folhas de ambos os genótipos e de 50% nas raízes do BRS 321, quando comparados aos respectivos controles. Os teores de glutamato nas raízes do genótipo Catissol não foram afetados pela salinidade (Figura 15B).

Sob condições controle, os teores de glutamina das folhas nas plantas do genótipo Catissol foram maiores que os do BRS 321 (Figura 15C). Já na presença de NaCl, as concentrações desse aminoácido foram fortemente aumentados em ambos os genótipos, sendo os efeitos mais proeminentes no BRS 321 (aumento de 24 vezes), quando comparados ao controle. Já nas raízes, na ausência de salinidade, ambos os genótipos apresentaram concentrações similares de glutamina (Figura 15D). Em contrapartida, o estresse salino promoveu aumentos nos níveis de concentração desse aminoácido, sendo os acréscimos de 60% e 55%, respectivamente, nos genótipos Catissol e BRS 321, quando comparados ao controle (Figura 15D).

Na ausência de NaCl, os teores de serina apresentaram valores similares nos tecidos das plantas dos dois genótipos avaliados, enquanto que sob condições de estresse, plantas do genótipo Catissol mostraram teores desse aminoácido inferiores às do BRS 321, independente do órgão investigado (Figura 15E). Nas folhas, o estresse salino originou grandes acréscimos nos teores de serina em ambos os genótipos de girassol (aumento de 3 vezes no Catissol e 14 vezes no BRS 321). Já nas raízes, os teores de serina foram pouco afetados pela salinidade, sendo observada somente uma leve redução nas condições de estresse salino do genótipo Catissol (Figura 15F).



**Figura 15.** Teores dos aminoácidos glutamato, glutamina e serina em folhas (A, C e E) e raízes (B, D e F) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □ ) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■ ). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.



**Figura 16.** Teores dos aminoácidos aspartato e asparagina em folhas (A e C) e raízes (B e D) de plantas de girassol, genótipos Catissol e BRS 321, crescendo em solução nutritiva sem NaCl (controle, □) e com NaCl a 100 mM (estresse, ■). Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em uma mesma condição de crescimento, ou maiúsculas iguais, em um mesmo genótipo, não diferem estatisticamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão.

Os teores de aspartato nas folhas, sob condições controle, foram significativamente maiores no genótipo Catissol (Figura 16A). Com o estresse salino, os teores desse aminoácido foram reduzidos nesse genótipo e permaneceram inalterados no BRS 321. Não foram registradas diferenças significativas nos teores de aspartato entre os genótipos submetidos ao estresse salino (Figura 16A). Diferentemente do ocorrido para as folhas, os teores desse aminoácido nas raízes, na ausência de estresse, foram superiores no genótipo BRS 321 (Figura 16B). A salinidade reduziu consideravelmente os teores desse aminoácido nas raízes de ambos os genótipos, contudo, nessa condição de estresse, o genótipo Catissol apresentou 34% mais aspartato que o genótipo BRS 321 (Figura 16B).

Com relação aos teores de asparagina, os controles do genótipo Catissol apresentaram valores superiores aos do genótipo BRS 321, tanto em folhas como em raízes (Figura 16C, D). O estresse salino imposto afetou diferentemente os teores desse aminoácido, variando em função do órgão e do genótipo analisado. Nas folhas, a salinidade aumentou drasticamente os teores de asparagina em relação ao controle, em ambos os genótipos de girassol, sendo esses aumentos de 67% no Catissol e 516% no BRS 321, propiciando valores para o BRS 321 127% maiores que àqueles do genótipo Catissol (Figura 16C). Em contraste, nas raízes das plantas sob estresse salino, os teores de asparagina diminuíram em relação ao controle, tanto no genótipo Catissol (redução de 30%) quanto no BRS 321 (redução de 21%) (Figura 16D). Sob condições de salinidade, os teores de asparagina não diferiram entre os dois genótipos.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Genótipos de girassol exibem tolerância diferencial à salinidade

A biomassa da parte aérea e das raízes de ambos os genótipos foi significativamente reduzida pela salinidade. No entanto, uma maior tolerância à salinidade foi exibida pelo genótipo BRS 321, em relação ao genótipo Catissol, sendo observados efeitos negativos menos acentuados nos teores de massa seca da parte aérea e da área foliar desse genótipo (Figura 1A, D). Esses resultados são contraditórios aos estudos de seleção de genótipos de girassol contrastantes à salinidade realizados por Mota *et al.* (2012), em que o genótipo Catissol é considerado tolerante às condições salinas. Essa contradição possivelmente está envolvida com o método de avaliação utilizado por esses autores, que envolveu somente medidas de massas secas. Diversos estudos apontam o acúmulo de biomassa como um índice essencial para avaliar o grau de tolerância das plantas aos estresses abióticos (JANMOHAMMADI *et al.*, 2012; ABREU *et al.*, 2014). Vários autores têm mostrado o efeito inibitório do estresse salino na produção de biomassa de folhas e das raízes (HAJLAOUI *et al.*, 2010; ZÖRB *et al.*, 2013). Zahra *et al.* (2014) em estudos com cultivares de trigo com tolerância diferencial à salinidade, observaram que o crescimento da parte aérea e raízes foi reduzido pelo estresse salino (150 e 300 mM de NaCl), porém a redução foi relativamente menor no genótipo tolerante.

Diversos estudos apontam que um dos primeiros sintomas do estresse salino nos tecidos das plantas é a diminuição do teor relativo de água (TRA) (HALDER; BURRAGE, 2003; FARKHONDEH *et al.*, 2012). No presente estudo, o estresse salino imposto não foi capaz de alterar o TRA das plantas de girassol dos genótipos Catissol e BRS 321, possivelmente pela utilização do sistema hidropônico no experimento, que não permite que as plantas fiquem sujeitas a estresse hídrico. Qin *et al.* (2010) em estudos com *Shepherdia argentea* submetidas a várias concentrações salinas (200, 400 e 600 mM de NaCl) observaram que a salinidade reduziu significativamente o TRA em folhas somente nas concentrações superiores a 400 e 600 mM.

A maior sensibilidade ao estresse salino das plantas do genótipo Catissol, evidenciada pelos menores índices de massa seca e de área foliar, foi relacionada com a menor assimilação de CO<sub>2</sub> sob salinidade (Figuras 1 e 5A), enquanto no genótipo mais tolerante não foram registradas alterações nas taxas de fotossíntese líquida (Figura 5A). De certa forma esses

resultados corroboram com trabalhos que mostram que a fotossíntese tem sido selecionada um indicador bioquímico de tolerância à salinidade em diversas culturas (QIU *et al.*, 2011; ZAHRA *et al.*, 2014).

Em geral, a redução da fotossíntese de plantas sob estresse salino pode ocorrer em função de fatores estomáticos e não-estomáticos (CHEN *et al.*, 2005; YAMANE *et al.*, 2012). Dentre os fatores estomáticos, pode-se citar principalmente a redução da disponibilidade de CO<sub>2</sub> para a atividade da Rubisco (HURA *et al.*, 2007); enquanto que os fatores não estomáticos são atribuídos aos decréscimos na eficiência dos processos bioquímicos, tais como ao baixo transporte de elétrons através cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto e a inibição da atividade de diversas enzimas relacionadas à assimilação de CO<sub>2</sub> (WISE *et al.*, 2004; THIAGARAJAN *et al.*, 2007). Lima Neto *et al.* (2014) em estudos com espécies que exibem respostas contrastantes à salinidade, *Ricinus communis* (tolerante) e *Jatropha curcas* (sensível), mostraram que a fotossíntese diminuiu intensamente em ambas as espécies, mas a redução foi mais acentuada em *Jatropha curcas*, com a maior redução da fotossíntese na espécie sensível ao sal sendo atribuída a diminuição na atividade inicial da Rubisco sob estresse salino.

No presente estudo, a redução da fotossíntese nas plantas do genótipo Catissol parece estar mais relacionada a danos no aparato fotossintético do que a limitações estomáticas (Figura 5). Evidência disso é que, em ambos os genótipos, tanto a condutância estomática quanto a concentração interna de CO<sub>2</sub> (dados não mostrados) não foram alteradas pela salinidade.

Alterações mais drásticas nas medidas de crescimento e reduções nos teores de clorofila e carotenóides nas plantas do genótipo Catissol, possivelmente estão relacionados com a redução da fotossíntese nesse genótipo. Outro fator preponderante para a redução da fotossíntese, nas plantas do genótipo sensível, pode ter sido o maior acúmulo de Na<sup>+</sup> nos tecidos bem como a baixa eficiência dos processos de transporte que controlam o acúmulo deste íon tóxico no citosol das células (OLÍAS *et al.*, 2009; CRAIG-PLEIT; MØLLER, 2010).

No presente estudo, pode-se afirmar que a maior tolerância à salinidade do genótipo BR 321 foi diretamente correlacionada com o melhor controle da homeostase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> nos tecidos radiculares (Figuras 1 e 6F). Sob salinidade, plantas desse genótipo exibiram maiores teores de K<sup>+</sup> e restringiram o acúmulo de Na<sup>+</sup>, quando comparadas àquelas do genótipo Catissol (Figura 6). Como resultado, principalmente, do menor acúmulo de Na<sup>+</sup> nas raízes do genótipo BRS 321, uma menor relação Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> foi estabelecida sob estresse salino (Figuras 6B e 6F).

O reestabelecimento da homeostase iônica envolvendo o maior acúmulo de  $K^+$  e baixas concentrações de  $Na^+$  tem sido outro fator determinante para o crescimento de plantas expostas ao estresse salino (WANG *et al.*, 2009; CRAIG PLETT; MØLLER, 2010; DING *et al.*, 2010). No entanto, diferentes autores consideram que a tolerância à salinidade está mais fortemente correlacionada à manutenção de uma menor relação  $Na^+/K^+$  (ou maior relação  $K^+/Na^+$ ), do que apenas à manutenção de baixos teores de  $Na^+$  (SHABALA, 2009; ABIDEEM *et al.*, 2014). Evidências experimentais para essa hipótese foram obtidas em estudos com genótipos de soja sob estresse salino, em que a manutenção da homeostase  $K^+/Na^+$  nas células das raízes do genótipo Lee 68 (tolerante) foi maior que o genótipo Jackson (sensível) (MA *et al.*, 2014). A elevação dos teores de  $K^+$  é considerada fundamental para a homeostase iônica das células vegetais, pois o  $K^+$  atua como cofator para várias enzimas citosólicas (ARMENGAUD *et al.*, 2009). A manutenção das concentrações intracelulares de  $K^+$  em células vegetais e a partição desse íon entre diferentes tecidos e órgãos da planta é um processo regulado pela atividade de diversas proteínas de transporte (CUIN; SHABALA, 2007; ANSCHÜTZ *et al.*, 2014). Com isso, os sistemas de absorção desse íon possibilitam as plantas se adaptarem as variações ambientais de K, permitindo manutenção de níveis adequados desse íon para as funções fisiológicas e bioquímicas das plantas (DEINLEIN *et al.*, 2014).

A redução do acúmulo de  $Na^+$ , nas raízes do genótipo BRS 321, pode ter sido ocasionada pelo influxo limitado de  $Na^+$  através da membrana plasmática das raízes, bem como pela ativação de mecanismos de exclusão desse íon tóxico das células (CRAIG PLETT; MØLLER, 2010). Além disso, os dados obtidos neste estudo sugerem a participação de mecanismos de controle de  $Na^+$  nas plantas do genótipo tolerante. O menor conteúdo de  $Na^+$  nas raízes do genótipo tolerante (Fig. 6B) pode ter sido resultado de um maior transporte desse íon para a parte aérea, via carregamento do xilema (Figura 7A), através dos transportadores *SOS1* (OLÍAS *et al.*, 2009). Além disso, o  $Na^+$  exportado para a parte aérea provavelmente foi armazenado nos caules, por meio da atividade dos transportadores *HKT* e/ou compartimentalizados nos vacúolos das folhas através dos transportadores *NHX*. Dessa forma, o  $Na^+$  não interferiu na atividade das enzimas citosólicas dependente de  $K^+$  (MØLLER *et al.*, 2009), evidência disso é que a fotossíntese das plantas do genótipo BRS 321 (Figura 5A) não foi alterada pelo estresse salino. No entanto, o aumento da tolerância ao sal por meio da redução do transporte de  $Na^+$  das raízes para parte aérea tem sido relatado (YASAR *et al.*, 2006; HUERTAS *et al.*, 2012). Por exemplo, Zhang *et al.* (2013) em estudos com *Broussonetia papyrifera*, observaram um grande acúmulo de  $Na^+$  nas raízes sob alta concentração de NaCl (150 mM) em comparação àqueles de caules

e folhas. Esses autores sugerem que, para manter baixas concentrações de Na<sup>+</sup> no citoplasma, o excesso de Na<sup>+</sup> nas raízes pode ter sido sequestrado para o interior dos vacúolos por meio da atividade de transportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHX) presentes no tonoplasto.

## **5.2 Os pigmentos fotossintetizantes tem influência direta na performance fotossintética de plantas tolerantes à salinidade**

Para avaliar se a manutenção da assimilação de CO<sub>2</sub> do genótipo de girassol mais tolerante ao estresse salino (o BRS 321) tem relação com o incremento ou conservação dos pigmentos fotossintéticos, os teores de clorofila e carotenóides foram mensurados. Embora tenha sido registradas reduções pela salinidade nos pigmentos de ambos os genótipos, os efeitos mais pronunciados foram encontrados no genótipo Catissol (Figura 3). Dessa forma, a manutenção dos parâmetros fotossintéticos nas plantas do genótipo mais tolerante pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao maior conteúdo de clorofila e carotenóides (Figuras 1 e 3). Essa resposta corrobora com os dados relatados na literatura, em que vários estudos têm citado reduções nos pigmentos fotossintéticos pela salinidade (AI-ABDOULHADI *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2013b). Mittal *et al.* (2012), em estudos com variedades de *Brassica juncea* observaram que os teores de clorofila diminuíram com o aumento da concentração de NaCl e da duração do estresse. Esses pesquisadores utilizaram a redução nos teores de clorofila como um indicador de tolerância à salinidade e observaram que a variedade Urvashi (sensível) apresentou maior degradação nos teores de clorofila quando comparada à variedade Bio902 (tolerante). Em plantas de girassol, a redução dos menores teores de clorofila no genótipo sensível pode ter sido resultado do aumento de sua degradação bem como da redução na síntese das enzimas responsáveis por esse processo, assim como observado para plantas de sorgo (MIRANDA *et al.*, 2014).

Nesse estudo, o genótipo tolerante apresentou maiores teores de clorofila provavelmente pelo menor conteúdo de Na<sup>+</sup> encontrado nas folhas desse genótipo. Por outro lado, a menor eficiência do genótipo sensível para controlar o acúmulo Na<sup>+</sup>, resultou em um maior conteúdo desse íon no citosol que provavelmente interferiu na atividade das enzimas de síntese de clorofila e carotenóides (Figuras 3 e 6) (JAMIL *et al.*, 2007; AL-ABDOULHADI *et al.*, 2012).

O acúmulo de antocianinas sob estresse salino tem sido relatado como essencial para prevenir danos foto-oxidativos às células das folhas, uma vez que essas moléculas são conhecidas por proporcionar fotoproteção através de sua atividade antioxidante (BEEN SAAD

*et al.*, 2012; HUGHES *et al.*, 2013). Os dados obtidos nesse estudo sugerem que as plantas do genótipo tolerante não apresentaram danos oxidativos em excesso nas folhas, uma vez que os teores de antocianinas e os parâmetros fotossintéticos permaneceram inalterados (Figuras 4 e 5). Por outro lado, sob salinidade, o genótipo Catissol acumulou 36% mais antocianinas que o controle (Figura 4). Dessa forma, pode-se especular que as reduções nas taxas de fotossíntese líquida e na eficiência da carboxilação da Rubisco, nas plantas estressadas do genótipo sensível ao NaCl, foram ocasionadas diretamente por danos oxidativos aos tecidos foliares (Figura 5).

### **5.3 A eficiência do fotossistema II revela papel chave na fotossíntese e na aclimação de plantas de girassol ao estresse salino**

Para investigar se o melhor desempenho da fotossíntese de plantas de girassol do genótipo mais tolerante à salinidade (o BRS 321) ocorre em função de uma maior eficiência da maquinaria fotossintética, os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram mensurados. De modo geral, os genótipos apresentaram mecanismos diferenciais de eficiência fotoquímica, bem como padrões distintos de regulação em condições de estresse salino. Plantas do genótipo tolerante exibiram valores de eficiência efetiva do PSII ( $\Phi$ PSII) e de taxa de transporte de elétrons (ETR) superiores ao do respectivo controle (Tabela 1). Dessa forma, o controle mais eficiente da  $\Phi$ PSII foi concordante com a regulação positiva da ETR, sugerindo que o genótipo BRS 321 obteve maior eficiência no sistema fotoquímico quando submetido a condições de estresse. De modo contrário, plantas do Catissol mostraram reduções nos valores de  $\Phi$ PSII e ETR, o que sugere um comprometimento na eficiência do sistema fotoquímico, provavelmente devido a danos causados pelo excesso de energia.

A  $\Phi$ PSII estima a eficiência com que a luz absorvida pelo PSII é usada para redução da quinona A (QA), ou seja, indica a fração de energia absorvida pela clorofila associada ao PSII que foi utilizada em atividade fotoquímica. Já a ETR, outro parâmetro fotoquímico, estima a taxa de transporte não cíclico de elétrons através PSII (BAKER, 2008). Esses parâmetros apresentam forte correlação, pois se a ETR que passa através do PSII é reduzida, isso significa que o PSII está sofrendo regulação negativa na captação de energia. Assim, a energia em excesso reduz ainda mais sua eficiência.

Neste estudo, os valores de Fv/Fm nos genótipos de girassol não apresentaram alterações significativas com a salinidade (Tabela 1), o que indica que não ocorreu fotoinibição

e/ou fotodano ao PSII. Tais resultados diferem daqueles encontrados em diversas espécies de plantas, em que reduções na relação  $F_v/F_m$  são frequentemente relatadas quando as plantas são expostas à estresses ambientais e estão associadas a danos nos cloroplastos, principalmente nas membranas dos tilacóides (YAMANE *et al.*, 2003; ARAGÃO *et al.*, 2012).

Uma consequência da redução da fotossíntese causada por estresses abióticos é a exposição da planta ao excesso de energia, o qual, se não for seguramente dissipada, pode causar mudanças no estado funcional dos cloroplastos (SANTOS *et al.*, 2013). Dessa forma, os mecanismos de dissipação de energia constituem um importante indicativo da eficiência do aparato fotossintético de plantas sob estresse salino. O *quenching* fotoquímico (qP) resulta do uso da energia de excitação no PSII para dirigir o transporte de elétrons do P680 para a QA (BAKER, 2008). Neste estudo, a ausência de alterações significativas no qP e a maior ETR no genótipo BRS 321 (Tabela 1) sugere a participação de mecanismos diferenciais de dissipação de energia entre os genótipos estudados. Para o genótipo mais tolerante, a maior da parte da energia absorvida foi utilizada para manter o fluxo de elétrons entre os fotossistemas e, conseqüentemente, para a formação de NADH e ATP (BAKER, 2008). Para o genótipo sensível, os dados sugerem que uma quantidade substancial da energia absorvida não foi direcionada para os centros de reações, como evidenciado pelos decréscimos no  $\Phi_{PSII}$  e na ETR. Nesse genótipo, a energia em excesso sob estresse salino foi dissipada por meio de processos não fotoquímicos, tais como pela dissipação térmica ou pelo ciclo das xantofilas, resultando em um aumento do *quenching* não fotoquímico (NPQ) (Tabela 1) (JUNEAU *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2010).

A dissipação de energia por meio do NPQ é um importante mecanismo de proteção do aparato fotossintético contra o excesso de energia fotossintetizante (LI *et al.*, 2010). Contudo, apesar dos mecanismos utilizados pelas plantas do genótipo Catissol para evitar danos ao aparato fotossintético, tais como, estabilidade na relação  $F_v/F_m$  e aumento do NPQ, não foi possível evitar o comprometimento do fotossistema gerado pelo estresse salino, já que as  $\Phi_{PSII}$  e ETR sofreram reduções significativas em tais condições (Tabela 1).

Em geral, os resultados obtidos mostraram que a salinidade não promoveu danos fotoquímicos no genótipo BRS 321, possivelmente pelo consumo mais eficiente de energia. Como consequência, esse genótipo conseguiu manter a estabilidade na fotossíntese, mesmo em condições de estresse. Diversos autores relacionam a importância do mecanismo de dissipar o excesso de energia para evitar fotoinibição e fotodano sob estresses abióticos (SILVA *et al.*,

2010; WILHELM; SELMAR, 2011). Segundo Lima Neto *et al.* (2014) plantas tolerantes ao sal apresentam um mecanismo de fotoproteção mais eficiente, possivelmente por dissipar o excesso energia na forma de calor e, assim, proteger o PSII contra danos.

A análise conjunta dos dados de fotossíntese, pigmentos fotossintéticos e eficiência do fotossistema II sugere que o genótipo BRS 321 utiliza mecanismos eficientes para evitar o excesso de energia provocado pelo estresse salino (Figuras 3, 4 e 5; Tabela 1). No entanto, embora o qP das plantas do genótipo tenha se mantido inalterado, outro mecanismo de dissipação de energia parece ter atuado sob estresse salino, uma vez que menos moléculas antenas, tais como as clorofilas (Figura 3; Tabela 1), estavam disponíveis para a absorção de energia. Uma provável via de utilização direta de energia seria a assimilação do nitrogênio, tendo em vista que é um processo em que alguns passos ocorrem dentro dos cloroplastos e apresentam consumo razoável de elétrons (FOYER *et al.*, 2009; ARAGÃO *et al.*, 2012). Portanto, é plausível lançar a hipótese de que os processos de redução, envolvidos na assimilação do N, atuaram como um dissipador de elétrons na cadeia transportadora de transporte de elétrons da membrana dos tilacóides e, dessa forma, minimizaram os efeitos nocivos provocados pelo excesso de energia em virtude da redução dos pigmentos pela salinidade (ARAGÃO *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2014).

#### **5.4 A assimilação do nitrogênio pode estar envolvida na redução dos efeitos deletérios da salinidade sob a maquinaria fotossintética**

Para verificar se a assimilação do nitrogênio opera como um possível mecanismo dissipador do excesso de elétrons nas plantas submetidas à salinidade, a atividade das enzimas envolvidas na assimilação de N, os teores de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  e de aminoácidos livres de plantas de ambos os genótipos de girassol foram investigados. A assimilação de nitrogênio e a síntese de aminoácidos são processos que consomem quantidades consideráveis de energia (elétrons e ATP) (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010; ARAGÃO *et al.*, 2012) e, dessa forma, esses processos agem atenuando os efeitos causados pela salinidade.

Neste estudo, as principais alterações nos processos de assimilação do nitrogênio ocorreram nos tecidos aéreos (Figuras 10 a 16). A redução do influxo de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema das plantas de ambos os genótipos, acoplada aos teores inalterados deste íon nas raízes, bem como a manutenção da atividade da RN nesse órgão, sugere a rápida conversão do  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  nos tecidos radiculares e subsequente transporte para a parte aérea (Figuras 8 e 9).

Ademais, as reduções dos teores de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes de plantas sensíveis à salinidade não podem ter sido originadas do decréscimo na sua absorção pelos tecidos radiculares, o que ocasionaria diminuições no carregamento de  $\text{NO}_3^-$  no xilema (DEBOUBA *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2007; DEBOUBA *et al.*, 2013). Evidência para essa hipótese é que os teores de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas foram similarmente reduzidos pelo estresse salino e os teores de  $\text{NH}_4^+$  na seixa do xilema e nos tecidos aéreos foram significativamente aumentadas (Figuras 8A, 8C e 9).

Adicionalmente, os decréscimos nas atividades da RN e NiR das folhas foram diretamente correlacionados com a baixa disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  em condições salinas (Figuras 8A, 10 e 11). Vale ressaltar ainda que, a regulação negativa mais conspícua na atividade das enzimas RN e NiR das raízes das plantas do genótipo sensível pode também ter sido resultado do acúmulo excessivo de  $\text{Na}^+$  nos tecidos radiculares (Figuras 8B, 10B e 11B) (DEBOUBA *et al.*, 2007). De modo similar ao observado nesse estudo, Debouba *et al.* (2013) observaram reduções nos teores de  $\text{NO}_3^-$  e aumentos nos de  $\text{NH}_4^+$  em ambos os órgãos das plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a 100 mM de NaCl. Além disso, diversos estudos evidenciaram que, sob condições de salinidade, a atividade da RN pode sofrer redução associada, ou não, com a diminuição na sua expressão gênica (SURABHI *et al.*, 2008).

No presente estudo, o aumento da atividade da GS e a manutenção da atividade da GOGAT nas folhas do genótipo BRS 321 sob salinidade sugere fortemente uma assimilação mais efetiva de  $\text{NH}_4^+$ , a qual pode ter contribuído para atenuar os efeitos negativos na fotossíntese causados pela salinidade, bem como para evitar efeitos tóxicos provocados por um provável excesso de  $\text{NH}_4^+$  (Figuras 12 e 13). Adicionalmente, o incremento na atividade das enzimas GS e manutenção da GOGAT nas folhas do genótipo tolerante pode responder a hipótese lançada de um mecanismo secundário de dissipação de energia sob estresse salino. Nesse contexto, a energia utilizada para a síntese de aminoácidos pelas GS e GOGAT atuou como dreno alternativo para a pressão de elétrons na cadeia transportadora de elétrons dos cloroplastos sob salinidade aumentando o transporte dos mesmos nos tilacóides (Tabela 1). Além disso, a maior ativação dos processos de assimilação de nitrogênio resultou em incrementos nos teores dos aminoácidos glutamina e serina e, conseqüentemente, de N-aminossolúveis (Figuras 14, 15C e 15E). Tais moléculas podem ter operado como solutos compatíveis no ajustamento osmótico das plantas sob estresse, um importante mecanismo de resposta à estresses abióticos (SILVA *et al.* 2010b; ZHONGHUA *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram identificar alguns dos mecanismos que medeiam à aclimação de plantas de girassol à salinidade. Dentre os principais processos envolvidos com à tolerância ao estresse salino, destacam-se os processos fotossintéticos, a eficiência do fotossistema II e o controle efetivo da homeostase iônica. Nossos dados apontam a participação indireta da assimilação do nitrogênio nas respostas das plantas ao estresse salino, atuando como dreno alternativo na dissipação do excesso de energia, em paralelo com a dissipação fotoquímica de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Contudo uma investigação mais detalhada a respeito dos mecanismos envolvidos com a tolerância ao estresse salino, especialmente no genótipo BRS 321, se faz necessária de modo que tais conhecimentos possam ser úteis para estabelecer um cultivo mais produtivo em solos com altas concentrações de sais.

## 6 CONCLUSÕES

1. O genótipo BRS 321 apresentou maior tolerância à salinidade do que o genótipo Catissol, comprovado pelos efeitos menos acentuados na produção de biomassa, ao menor acúmulo de  $\text{Na}^+$  e a manutenção da fotossíntese líquida desse genótipo;
2. O acúmulo nos teores de clorofila e carotenóides no genótipo BRS 321 resultou em altas taxas de assimilação de  $\text{CO}_2$  sob salinidade;
3. O consumo mais eficiente de energia das plantas do genótipo BRS 321, evidenciado pelo aumento na eficiência efetiva do fotossistema II e pela alta taxa de transporte de elétrons, foi crucial para a maior dissipação de energia desse genótipo sob estresse salino;
4. A alta eficiência da assimilação do  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  e do transporte desse, via xilema, para os tecidos aéreos e o acúmulo desse íon nas folhas do genótipo BRS 321, contribuiu para aprimorar a assimilação do N e manter a síntese de aminoácidos sob condições de salinidade;
5. O melhor desempenho da atividade das enzimas GS e GOGAT e o maior acúmulo de N-aminossolúveis e dos aminoácidos glutamina e serina, principalmente nas folhas do genótipo BRS 321, atuaram como mecanismo secundário na dissipação do excesso de energia, aliviando os efeitos deletérios do estresse salino;

## REFERÊNCIAS

- ABIDEEN, Z.; KOYRO, H.; HUCHZERMEYER, B.; AHMEDA, M. Z.; GULA, B.; KHAND, M. A. Moderate salinity stimulates growth and photosynthesis of *Phragmites karka* by water relations and tissue specific ion regulation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 105, p. 70-76, 2014.
- ABOGADALLAH, G. M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling and Behavior**, v. 5, p. 369-374, 2010.
- ABREU, C. E.; ARAÚJO, G. S.; MONTEIRO-MOREIRA A. C.; COSTA, J. H.; LEITE, H. B.; MORENO F. B.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 1289-1306, 2014.
- AL-ABDOULHADI, I. A.; DINAR, H. A.; EBERT, G.; BÜTTNER, C. 2012. Influence of salinity levels on nutrient content in leaf, stem and root of major date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science**, v. 2, p. 341-346, 2012.
- ALEMÁN, F.; NIEVES-CORDONES, M.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. Root K<sup>+</sup> acquisition in plants. The *Arabidopsis thaliana* model. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, p. 1603-1612, 2011.
- AMOR, N. B.; HAMED, K. B.; DEBEZ, A.; GRIGNON, C.; CRABBEDLY. Physiological and antioxidant responses of perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. **Plant Science**, v. 4, p. 889-899, 2005.
- ANSCHÜTZ, U.; BECKER, D.; SHABALA, S. Going beyond nutrition: Regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment? **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 670-687, 2014.
- ARAGÃO, R. M.; SILVA, E. N.; VIEIRA, C. F.; SILVEIRA, J. A. G. High supply of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mitigates salinity effects through an enhancement in the efficiency of photosystem II and CO<sub>2</sub> assimilation in *Jatropha curcas* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 2135-2143, 2012.
- ARAGÃO, R. M.; SILVA, J. S.; LIMA, C. S.; SILVEIRA, J. A. G. Salinidade modula negativamente a absorção e assimilação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em plantas de feijão de corda, **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 382-389, 2011.
- ARMENGAUD, P.; SULPICE, R.; MILLER, A. J.; STITT, M.; AMTMANN, A.; GIBON, Y. Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of potassium nutrition for glycolysis and nitrogen assimilation in *Arabidopsis* roots. **Plant Physiology**, v. 150, p. 772-785, 2009.

- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.
- AVERINA, N. G.; BEYZAEI, Z.; SHCHERBAKOV, R. A.; USATOV, A. V. Role of Nitrogen metabolism in the development of salt tolerance in barley plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 61, p. 97-104, 2012.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. Y.; 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.
- BADRAN, E.G. Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedling. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 90, p. 8-18, 2008.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.
- BANYS, V. L.; TIESENHAUSEN, I. M. E. V. V.; FALCO, J. E.; OLIVEIRA, A. I. G.; SILVA, R. H. Consórcio milho-girassol: características agronômicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 20, p. 84-89, 1996.
- BAVEI, V.; SHIRAN, B.; ARZANI, A. Evaluation of salinity tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using ion accumulation, proline and peroxidase criteria. **Plant Growth Regulation**, v. 64, p. 275-285, 2011.
- BEEN SAAD, R.; FABRE, D.; MIEULET, D.; MEYNARD, D.; DINGKUHN, M.; AL-DOSS, A.; HASSAIRI, A. Expression of the *Aeluropus littoralis* ALSAP gene in rice confers broad tolerance to abiotic stresses through maintenance of photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, p. 626-643, 2012.
- BHERING, L. L.; BARRERA, C. F.; ORTEGA, D.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A.; ROSADO, T. B.; CRUZ, C. D. Differential response of *Jatropha* genotypes to different selection methods indicates that combined selection is more suited than other methods for rapid improvement of the species. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 260-265, 2013.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimate on of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, p. 278- 293, 1966.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Lei nº 9.456/97, de 25 de BRIL DE 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 abril. 1997. Disponível em:

<http://www.2.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/proAcao/proTecnologia/proIntelectual/lei9456.pdf>> Acesso em: 26 nov 2012.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, E. (Ed). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plants Physiologists, 2000, p. 1158-1203.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, p. 365-372, 2000.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1367, 2000.

BYBORDI, A.; EBRAHIMIAN, E. Effect of salinity stress on activity of enzymes involved in nitrogen and phosphorous metabolism case study: canolla (*Brassica napus* L.). **Asian Journal of Agricultural Research**, v. 5, p. 208-214, 2011.

CABELLO-PASINI, A.; MACÍAS-CARRANZA, V.; ABDALA, R.; KORBEE, N.; FIGUEROA, F. L. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 363-369, 2011.

CARVALHO, C. G. P.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, A. C. B.; CASTIGLIONI, V. B. R. Genética do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. de C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, p. 219-267, 2005.

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

CATSKY, J. Determination of water deficits in disc cut out from leaf blades. **Biologia Plantarum**, v. 2, p. 929- 938, 1960.

CHAMBÓ, E. D.; GARCIAI, R. G.; OLIVEIRA, N. T. E. O.; DUARTE-JÚNIOR, J. B. Honey bee visitation to sunflower: effects on pollination and plant genotype. *Scientia Agricola*, v. 68, p. 647-651, 2011.

CHAVES, M. M.; COSTA, J. M.; MADEIRA-SABO, N. J. Recent advances in photosynthesis under drought and salinity. **Advances in Botanical Research**, v. 57, p. 49-104, 2011.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany London**, v. 103, p. 551-560, 2009.

CHEN, Z. H.; NEWMAN, I.; ZHOU, M. X.; MENDHAM, N.; ZHANG, G. P.; SHABALA, S. Screening plants for salt tolerance by measuring K<sup>+</sup> flux: a case study for barley. **Plant Cell and Environment**, v. 28, p. 1230-1246, 2005.

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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Girassol: conjuntura mensal** – novembro de 2011. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_12\\_14\\_16\\_05\\_46\\_girassolnovembro2011.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_14_16_05_46_girassolnovembro2011.pdf)>. Acesso em: 26 nov 2012.

CORDEIRO, Y. E. M.; PINHEIRO, H. A.; SANTOS FILHO, B. G.; CORREA, S. S.; SILVA, J. R. R.; DIAS-FILHO, M. B. Physiological and morphological responses of young mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plants to drought. **Forest Ecology and Management**, v. 258, p. 1449-1455, 2009.

CRAIG PLETT, D.; MØLLER, I. S. Na<sup>+</sup> transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 612–626, 2010.

CRAWFORD N. M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v. 31, p. 389-395, 1988.

CUIN, T. A.; SHABALA, S. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 7, p. 875-885, 2007.

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.; KUDOYAROVA, G.; HARTUNG, W. Long-distance ABA signalling and its relation to other signalling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 285-295, 2005.

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

DEBOUBA, M.; MAAROUFI-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.

DEBOUBA, M.; DGUIMI, H. M.; GHORBEL, M.; GOUIA, H.; SUZUKI, A. Expression pattern of genes encoding nitrate and ammonium assimilating enzymes in *Arabidopsis thaliana* exposed to short term NaCl stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 155- 160, 2013.

- DEINLEIN, U.; STEPHAN, A. B.; HORIE, T.; LUO, W.; XU, G.; SCHROEDER, J. I. Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 371- 379, 2014.
- DING, M.; HOU, P.; SHEN, X.; WANG, M.; SHURONG DENG, S.; •JIAN SUN, J.; XIAO, F.; WANG, R.; ZHOU, X.; LU, C.; ZHANG, D.; ZHENG, X.; HU, Z.; CHEN, S.; Salt-induced expression of genes related to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and ROS homeostasis in leaves of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. **Plant Molecular Biology**, v. 73, p. 251-269, 2010.
- DLUZNIEWSKA, P.; GRESSLER, 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.
- FAGERIA, N. K.; GHEYI, H. R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: GHEYI, H. R., QUEIROZ, J. E., MEDEIROS, J. F. **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB, SBEA, p. 363-383, 1997.
- FAO – Food and Agriculture Organization. **TERRASTAT – Land resource potencial and constraints statistics at country and regional level**. 2012. Disponível em:<<http://fao.org/nr/land/information-resources/terrastat/en/>>. Acesso em: 05 ago. 2012.
- FARKHONDEH, R.; NABIZADEH, E.; JALILNEZHAD, N. Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relations in two sugar beet cultivars. **International Journal of Agriscience**, v. 2, p. 385-392, 2012.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY, T. D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v.6, p. 269-279, 2004.
- FONSECA, E. A.; VÁZQUEZ, A. La Planta de girasol. In: (coord.), E. **Produccion de girasol**. Buenos Aires. Asociacion Argentina de consorcios regionales de Experimentacion Agrícola, p.17-22,1994.
- 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.; BLOOM, A. J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 455-484, 2009.
- GARG, N.; SINGLA, R., Nitrate reductase activity in roots and leaves of chickpea cultivars under salt stress. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 3, p. 248-252, 2005.
- GHARS, M. A.; PARRE, E.; DEBEZ, A.; BORDENAVE, M.; RICHARD, L.; LEPORTE, L.; BOUCHEREAU, A.; SAVOURE, A.; ABDELLY, C. Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity and proline accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 588-599, 2008.
- GLYNN, P.; FRASER, C.; GILLIAN, A. Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal of Arboriculture**, v. 29, p. 61-65, 2003.

GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J. H.; ALENCAR, N. L. M.; PRISCO, J. T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 62-71, 2012.

GORAI, M.; NEFFATI M. Germination responses of *Reaumuria vermiculata* to salinity and temperature. **Annals of Applied Biology**, v. 151, p.53-59, 2007.

GOVINDJEE, Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (Eds.). **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**. Dordrecht: Springer, p.1-41. 2005.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

GUOHUA, XU.; XIAORONG, FAN.; ANTHONY, J. Miller plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 153-82, 2012.

HAJLAOUI, H.; EL AYEB, N.; GARREC, J. P.; DENDEN, M. Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 122-130, 2010.

HALDER, K. P.; BURRAGE, S. W. Drought stress effects on water relations of rice grown in nutrient film technique. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 441-446, 2003.

HARPER, J. E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K. J., BENNETT. J. M., SINCLAIR, T.R.; PAULSEN, G. M. (eds.) **Physiology and determination of crop yield**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p. 285-302, 1994.

HEIDARI, M. Effects of salinity stress on growth, chlorophyll content and osmotic components of two basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 379-384, 2011.

HELALI, S. M.; NEBLI, H.; KADDOUR, R.; MAHMOUDI, H.; LACHAÂL, M.; OUERGHI, Z. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Soil**, v. 336, p. 65-74, 2010.

HOLANDA, J. S.; AMORIM, J. R. A.; FERREIRA NETO, M.; HOLANDA, A. C. Qualidade da água para irrigação. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p. 43-61, 2010.

HUANG, C.; WEI, G.; JIE, Y.; WANG, L.; RAN, H. Z. C.; HUANG, Z.; JIA H.; ANJUM, S. A. Effects of concentrations of sodium chloride on photosynthesis, antioxidative enzymes, growth and fiber yield of hybrid ramie. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.76, p. 86-93, 2014.

- HUERTAS, R.; OLÍAS, R.; ELJAKAOUI, Z.; GÁLVEZ, F. J.; LI, J.; DE MORALES, P. A.; BELVER, A.; RODRÍGUEZ-ROSALES, M. P. Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, p. 1467-482, 2012.
- HUGHES, N. M.; CARPENTER, K. L.; G. CANNON, J. G. Estimating contribution of anthocyanin pigments to osmotic adjustment during winter leaf reddening. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 230-233, 2013.
- HURA, T.; HURA, K.; GRZESIAK, M. Effect of long-term drought stress on leaf gas exchange and fluorescence parameters in C3 and C4 plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, p.103-113, 2007.
- HUSSAIN, K.; NISAR, M. F.; MAJEED, A.; NAWAZ, K.; BHATTI, K. H.; AFGHAN, S.; SHAHAZAD, A.; ZIA-UL-HUSSNIAN, S. What molecular mechanism is adapted by plants during salt stress tolerance? **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 416-422, 2010.
- IRELAND, R. J.; LEA, P. J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In: Singh, B. K. (Eds.). **Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology**. Marcel Dekker, New York, p. 49-109, 1999.
- JAMIL, M.; REHMAN, S.; LEE, K. J.; KIM, J. M.; KIM, H. S.; RHA, E. S. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 111-118, 2007.
- JANICKA-RUSSAK, M.; KŁOBUS, G. Modification of plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in response to NaCl and ABA. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 295-302, 2007.
- JANMOHAMMADI, M.; ABBASI, A.; SABAGHNIA, N. Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 99, p. 31-40, 2012.
- JUNEAU, P.; GREEN, B. R.; HARRISON, P. J. Simulation of pulse amplitude-modulated (PAM) fluorescence: limitations of some PAM parameters in studying environmental stress effects. **Photosynthetica**, v. 43, p. 75-83, 2005.
- KALAJI, H. M.; GOVINDJEE; BOSA, K.; KOS'CIELNIAK, J.; GOŁASZEWSKA, K. Z. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64-72, 2011.
- KANT, S., KANT, P., LIPS, H., BARAK, S. Partial substitution of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 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.
- KAYA, C.; TUNA, A. L.; ASHRAF, M.; ALTUNLU, H. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 397-403, 2007.

KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Impact of NaCl stress on plant growth and mineral nutrient assimilation in two cultivars of strawberry. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, p. 170-176, 2009.

KRONZUCKER, H. J.; COSKUN, D.; SCHULZE, L. M.; WONG, J. R.; BRITTO, D. T. Sodium as nutrient and toxicant. **Plant and Soil**, v. 369, p. 1-23, 2013.

KUSANO, M.; TABUCHI, M.; FUKUSHIMA, A.; DIAZ, C.; KOBAYASHI, M.; HAYASHI, N.; TSUCHIYA, Y. N.; TAKAHASHI, H.; KAMATA, A.; YAMAYA, T.; SAITO, K. Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice. **The Plant Journal**, v. 66, p. 456-466, 2011.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.

LEVITT, J. Responses of Plants to Environmental Stresses. In: **Water, Radiation, Salt and Other Stresses**. New York: Academic Press, 1980.

LI, R.; SHI, F.; FUKUDA, K.; YANG, Y. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 56, p. 725-733, 2010.

LIANG, J.; ZHANG, J.; WONG, M. H. Stomatal conductance in relation to xylem sap ABA concentration in two tropical trees: *Acacia confuse* and *Litsea glutinosa*. **Plant Cell and Environment**, v. 19, p. 93-100, 1996.

LIMA NETO, M. C.; LOBO, A. K. M.; MARTINS, M. O.; FONTENELE, A. V.; SILVEIRA, J. A. G. Dissipation of excess photosynthetic energy contributes to salinity tolerance: A comparative study of salt-tolerant *Ricinus communis* and salt-sensitive *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 23-30, 2014.

LIRA, M. A.; CARVALHO, H. W. L.; CHAGAS, M. C. M.; BRISTOT, G.; DANTAS, J. A.; LIMA, J. M. P. **Avaliação das potencialidades da cultura do girassol, como alternativa de cultivo no semiárido nordestino**. Natal - RN: EMPARN (Documentos, 40), 40p, 2011.

M'RAH, S.; NEBLI, H.; KADDOUR, R.; MAHMOUDI, H.; LACHAÂL, M.; OUERGHI, Z. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Soil**, v. 336, p. 65-74, 2010.

MA, H.; SONGA, L.; HUANG, Z.; YANG, Y.; WANG, S.; WANG, Z.; TONG, J.; GUC, W.; MA, H.; XIAO, L. Comparative proteomic analysis reveals molecular mechanism of seedling roots of different salt tolerant soybean genotypes in responses to salinity stress., **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 40-57, 2014.

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

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, p. 889, 1995.

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.

MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 979-87, 2002.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v. 274, p. 3-6, 2004.

MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2297-2306, 2007.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 453-467, 2010.

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.

MIRANDA, R. S.; MESQUITA, R. O.; FREITAS, N. S.; JOSÉ T. PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Nitrate: ammonium nutrition alleviates detrimental effects of salinity by enhancing photosystem II efficiency in sorghum plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p. 8-12, 2014

MIRANDA, R. S.; RUPPENTHAL, V.; LOPES, L. S.; VIEIRA, C. F.; MARQUES, V. B.; BEZERRA, M. A.; LACERDA, C. F. Phosphorus fertilization improves soybean growth under salt stress. **International Journal of Plant and Animal Science**, v. 01, p. 21-29, 2013b.

MITTAL, S.; KUMARI, N.; SHARMA, V. Differential response of salt stress on Brassica juncea: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 17-26, 2012.

MØLLER, I. S.; GILLIHAM, M.; JHA, D.; MAYO, G. M.; ROY, S. J.; COATES, J. C.; HASELOFF, J.; TESTER, M. Shoot  $Na^+$  exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of  $Na^+$  transport in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, p. 2163-2178, 2009.

- MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.
- MORAIS, F. A.; GURGEL, M. T.; OLIVEIRA, F. H. T.; MOTA, A. F. Influência da irrigação com água salina na cultura do girassol. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 327-336, 2011.
- MORALES, F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Photoinhibition and photoprotection under nutrient deficiencies, drought and salinity In: Demming-Adams, B.; Adams III, W. W.; Autar Matoo, A. K. (Eds.). **Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment**, p. 65-85, 2006.
- MOTA, K. N. A. B.; PEREIRA P. P. A.; MOURA I. C.; SANTOS, J. F.; AZEVEDO NETO, A. D. Seleção de genótipos de girassol com tolerância diferenciada ao estresse salino. In: **Fertilidade e Biologia do Solo**, 2012. Maceió. *Resumos...* Maceió: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2012.
- MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LAUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1025-1043, 2006.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.
- NAJAFPOUR, M. M.; PASHAEI, B. Photosynthesis: How and Why? In: NAJAFPOUR, M. M. (Eds). **Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects**. Rijeka: InTech, p. 3-12. 2012.
- NAZAR, R.; IQBAL, N.; SYEED, S.; N.A. KHAN, N. A. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p. 807-815, 2011.
- NEBAUER, S. G.; SÁNCHEZ, M.; MARTÍNEZ, L.; LLUCH, Y.; RENAU-MORATA, B.; MOLINA. R. V. Differences in photosynthetic performance and its correlation with growth among tomato cultivars in response to different salts. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 61-69, 2013.
- NEMAT-ALLA, M. M.; BADAWI, A. M.; HASSAN, N. M.; EL-BASTAWISY, Z. M.; NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, G. J.; BRESSAN-SMITH, R. E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 199-209, 2005.
- NOBRE, R. G.; GHEYI, H.R.; CORREIA, K. G.; SOARES, F. A. L.; ANDRADE, L. O. Crescimento e floração do girassol sob estresse salino e adubação nitrogenada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 3, p. 358-367, 2010.
- OLÍAS, R.; ELJAKAOUI, Z.; LI, J.; MORALES, P. A.; MARÍN-MANZANO, M. C.; PARDO, J. M.; BELVER, A. The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na<sup>+</sup> between plant organs. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 904-916, 2009.

OMOTO, E.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Effects of salinity stress on the structure of bundle sheath and mesophyll chloroplasts in NAD-malic enzyme and PCK type C4 plants. **Plant Production Science**, v. 13, p.169-176, 2010.

PARDO, J. M.; RUBIO, F. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters in plant signaling. In: GEISLER, M., VENEMA, K. (Eds.), **Transporters and Pumps in Plant Signaling**. Signaling and Communication in Plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 65-98, 2011.

PARVAIZ, A.; SATYAWATI, S. Salt stress and phytochemical responses of plants - a review. **Plant, Soil and Environment**, v. 54, p. 89-99, 2008.

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, p. 143-160, 2010.

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

QASIM, M.; ASHRAF, M.; ASHRAF, M.Y.; AHMAD, N. Relationship of biomass production with nitrate assimilation in canola (*Brassica napus* L.) under salinity stress. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 4, p. 521-522, 2002.

QIN, J.; DONG, W. Y.; HE, K. N.; YU, Y.; TAN, G. D.; HAN, L.; DONG, M.; ZHANG, Y. Y.; ZHANG, D.; LI, A. Z.; WANG, Z. L. NaCl salinity-induced changes in water status, ion contents and photosynthetic properties of *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt. Seedlings. **Plant, Soil and Environment**, v. 56, p. 325-332, 2010.

QIU, L.; WU, D. Z.; ALI, S.; CAI, S. G.; DAI, F.; ZHANG, G. P. Evaluation of salinity tolerance and analysis of allelic function of HvHKT1 and HvHKT2 in Tibetan wild barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, p. 695-703, 2011.

RAVEN, J. A.; SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytologist**, v. 76, p. 415-431, 1976.

RAZAVI, F.; POLLET, B.; STEPPE, K.; VAN LABEKE, M. C. Chlorophyll fluorescence as a tool for evaluation of drought stress in strawberry. **Photosynthetica**, v. 46, p. 631-633, 2008.

RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 44, p. 357-384, 1993.

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.

RUIZ-LOZANO, J. M.; PORCEL, R.; AZCÓN, C.; AROCA, R. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4033-4044, 2012.

SALEEM, A.; ASHRAF, M.; AKRAM, N. A. Salt (NaCl)-induced modulation in some key physiobiochemical attributes in okra (*Abelmoschus esculentus* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 97, p. 202-213, 2011.

SAMBORSKI, S.; KOZAK, M.; AZEVEDO, R. A. Does nitrogen uptake affect nitrogen uptake efficiency, or vice versa? **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 419-420, 2008.

SANTOS JÚNIOR, J. A.; GHEYI, H. R.; GUEDES FILHO, D. H.; DIAS, N. S.; SOARES, F. A. L. Cultivo de girassol em sistema hidropônico sob diferentes níveis de salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 842-849, 2011.

SANTOS, C. M.; VERISSIMO, V.; FILHO, H. C. L. W.; FERREIRA, V. M.; CAVALCANTE, P. G. S.; ROLIM, E. V.; ENDRES, L. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 203-213, 2013.

SCHOLANDER, P. F.; HAMEL, H. T.; BRADSTREET, E. D.; HEMMINGSEN, E. A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, p. 339-346, 1965.

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.

SHABALA, S. Salinity and programmed cell death: unraveling mechanisms for ion specific signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 709-711, 2009.

SHABALA, S.; CUIN, T. A. Potassium transport and plant salt tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 651-669, 2007.

SHAHBAZ, M.; ASHRAF, M.; AKRAM, N. A.; HANIF, A.; HAMEED S.; JOHAM, S.; REHMAN, R. Salt-induced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1113-1122, 2011.

SHAVRUKOV, Y. Salt stress or salt shock: which genes are we studying? **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p.119-127, 2013.

SHELL, G. S. G.; LANG, A. R. G. Movements of sunflower leaves over a 24-h period. **Agricultural Meteorology**, v. 16, p. 161-170, 1976.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. V.; RIBEIRO, R. V.; VIEGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1157-1164, 2010.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, p. 279-285, 2010b.

- SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Scientia Agricola**, vol.68, p. 62-68, 2011.
- SILVA, E. N.; VIEIRA, S. A.; RIBEIRO, R. V.; PONTE, L. F. A.; FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVEIRA, J. A. G. Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p.159-169, 2013.
- SILVA, M. L. O.; FARIA, M. A.; MORAIS, A. R.; ANDRADE, G. P.; LIMA, C. E. M. Crescimento e produtividade do girassol cultivado na entressafra com diferentes lâminas de água. **Engenharia Agrícola e ambiental**, Campina Grande, v.11, p.482-488, 2007.
- SILVEIRA, J. A. G.; MATOS, J. C. S.; CECCATO, V. M.; SAMPAIO, A. H.; COSTA, R. C. L.; VIÉGAS, R. A. Induction of nitrate reductase activity and nitrogen fixation in two *Phaseolus* species in relation to exogenous nitrate level. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Dehli, v. 4, p.19-26, 1998.
- SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 94-113, 2008.
- SUDHIR, P.; MURTHY, S. D. S. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 42, p. 481-486, 2004.
- SURABHI, G. K.; REDDYA, A. M.; KUMARIA, G. J.; SUDHAKARA, 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.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 5ª Edição. Sunderland: Sinauer Associates, 2010.
- TAKAHASHI, S.; BADGER, M. R. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II from photodamage. **Trends in plants science**, v. 16, p. 53-60, 2011.
- TAVAKKOLI, E.; RENGASAMY, P.; MCDONALD, G. K. High concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 4449-4459, 2010.
- TEAKLE, N. L.; TYERMAN, S. D. Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 566-589, 2010.
- THIAGARAJAN, A.; LADA, R.; JOY, P. Compensatory effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on the inhibitory effects of high temperature and irradiance on photosynthetic gas exchange in carrots. **Photosynthetica**, v. 45, p. 355-362, 2007.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1005-1024, 2000.

TRAVASSOS, K. D.; GHEYI, H. R.; SOARES, F. A. L.; BARROS, H. M. M.; DIAS, N. S.; UYEDA, C. A.; SILVA, F. V. Crescimento e desenvolvimento de variedades de girassol irrigado com água salina. **Irriga**, Botucatu, v.1, p. 324 - 339, 2012.

WANG, S. M.; ZHANG, J. L.; LIU, X. S.; LI, Z.; WU, G. Q.; CAI, J. Y.; FLOWERS, T. J.; WANG, S. M. *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na<sup>+</sup> level under salinity by limiting unidirectional Na<sup>+</sup> influx resulting in a high selectivity for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup>. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 486-496, 2009.

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

WILHELM, C.; SELMAR, D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 79–87, 2011.

WILKINSON, J. Q.; CRAWFORD, N. M. Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 239, p. 289-97, 1993.

WISE, R. R.; OLSON, A. J.; SCHRADER, S. M.; SHARKEY, T. D. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant, Cell and Environment**, v.27, p.717-724, 2004.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, J. A. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, v. 63, p. 153-182, 2012.

YAMANE, K.; KAWASAKI, M.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the ultrastructure of chloroplasts in rice seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 573-575, 2003.

YAMANE, K.; MITSUYA, S.; TANIGUCHI, W.; MIYAKE, H. Salt-induced chloroplast protrusion is the process of exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts into cytoplasm in leaves of rice. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, p. 1663-1671, 2012.

YAN, K.; CHEN, P.; SHAO, H.; ZHAO, S.; L. ZHANG, L. ZHANG, G. XU, J. SUN. Responses of Photosynthesis and Photosystem II to Higher Temperature and Salt Stress in Sorghum. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 198, p. 218-225, 2012.

YASAR, F.; UZAL, O.; TUFENKCIL, S.; YILDIZ, K. Ion accumulation in different organs of green bean genotypes grown under salt stress. **Plant Soil and Environment**, v. 52, p. 476-480, 2006.

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

YIN, Y.; LI, S.; LIAO, W.; LU, Q.; WEN, X.; LU, C. Photosystem II photochemistry, photoinhibition, and the xanthophyll cycle in heat-stressed rice leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 959-966, 2010.

ZAHRA, J.; NAZIM, H.; CAI, S.; HAN, Y.; WU, D.; ZHANG, B.; HAIDER, S. I.; ZHANG, G. The influence of salinity on cell ultrastructures and photosynthetic apparatus of barley genotypes differing in salt stress tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p. 1261-1269, 2014.

ZHANG, M.; FANG, Y.; YONGHUA, JI.; JIANG, Z.; WANG, L. Effects of salt stress on ion content, antioxidant enzymes and protein profile in different tissues of *Broussonetia papyrifera*. **South African Journal of Botany**, v. 85, p. 1-9, 2013.

ZHONGHUA T.; YANJU, L.; XIAORUI, G.; YUANGANG, Z. 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.

ZHOU, Q.; YU, B. Changes in content of free, conjugated and bound polyamines and osmotic adjustment in adaptation of vetiver grass to water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 417-425, 2010.

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p.1-5, 2003.

ZÖRB, C.; GEILFUS, C.; MÜHLING, K. H.; LUDWIG-MÜLLER, J. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 220-224, 2013.