



ADRIAN MOISES CONTRERAS GARCIA

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FONTES DE
NITROGÊNIO E A PERCEPÇÃO DE ETILENO NO
METABOLISMO, CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE
PLANTAS DE TOMATEIRO**

LAVRAS-MG

2023

ADRIAN MOISES CONTRERAS GARCIA

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FONTES DE NITROGÊNIO E A PERCEPÇÃO
DE ETILENO NO METABOLISMO, CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PLANTAS
DE TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Vitor de Laia Nascimento
Orientador

**LAVRAS-MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Garcia, Adrian Moisés Contreras.

Efeitos da interação entre fontes de nitrogênio e a percepção de etileno no metabolismo, crescimento e produção de plantas de tomateiro / Garcia, Adrian Moisés Contreras. - 2023. 40 p. : il.

Orientador(a): Vitor de Laia Nascimento.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. *Solanum lycopersicum*. 2. Amônio. 3. Eficiência no uso de nitrogênio. I. Nascimento, Vitor de Laia. II. Título.

ADRIAN MOISES CONTRERAS GARCIA

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE FONTES DE NITROGÊNIO E A PERCEPÇÃO
DE ETILENO NO METABOLISMO, CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PLANTAS
DE TOMATEIRO**

**EFFECTS OF THE INTERACTION BETWEEN NITROGEN SOURCES AND THE
PERCEPTION OF ETHYLENE ON THE METABOLISM, GROWTH AND
PRODUCTION OF TOMATO PLANTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal para obtenção do título de Mestre

APROVADA em 13 de julho de 2023

Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori-UFLA

Dr. Lucas de Ávila Silva

Prof. Dr. Vitor de Laia Nascimento

Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus nosso criador.

Aos meus queridos pais Adrián Contreras e Alma García pelo imenso apoio.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) por me dar a oportunidade de crescer profissional e academicamente.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal (UFLA).

Ao meu orientador Prof. Dr. Vitor de Laia Nascimento pelo valioso tempo e apoio para a conclusão deste trabalho.

Ao coordenador do programa Prof. Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori por sempre demonstrar interesse em ajudar.

Agradeço o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por disponibilizar recursos para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

O nitrogênio (N) é o nutriente que mais limita o crescimento e a produtividade das culturas agrícolas. O etileno é um fitormônio que desempenha um importante papel na integração de eventos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Apesar de já demonstrado algum grau de interação entre N e etileno, maiores detalhes da fisiologia de plantas em condições de estresse nutricional por variação de fonte N e alteração no metabolismo deste hormônio ainda são escassos. No presente trabalho, foram usadas plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) tipo selvagem (WT), como controle, e seu mutante hormonal *Never ripe* (*Nr*), que apresenta insensibilidade ao etileno, cultivadas em solução nutritiva com diferentes fontes inorgânicas de N (amônio - NH_4^+ e nitrato - NO_3^-) e uma mistura entre as duas fontes, em um fatorial simples 2 (genótipos) x 3 (fontes de N). Para fins de compreensão da interação entre fontes de N e a percepção do etileno, durante o experimento foram avaliados parâmetros de crescimento, de fotossíntese, níveis de marcadores bioquímicos, níveis de N total e as concentrações de NH_4^+ e NO_3^- . Os parâmetros de crescimento foram bastante alterados em relação às plantas tratadas com 100% de NH_4^+ e 100% de NO_3^- em *Nr*, que assimilou melhor essas fontes de N, sendo seu crescimento e produção aumentado em comparação com o WT. Quanto à fotossíntese, principalmente na fase fotoquímica, ocorrem danos nos fotossistemas quando as plantas controle são submetidas a 100% de NH_4^+ ; porém, *Nr* em relação ao genótipo WT, mostrou uma clara tolerância a esse estresse. Foram encontradas diversas diferenças nos parâmetros bioquímicos em relação às plantas tratadas com fontes de NH_4^+ e NO_3^- , em interação com a alteração hormonal, justificando que o mutante mostra sua maior produtividade e crescimento usando apenas NO_3^- como fonte de N. Os dados aqui encontrados confirmam que plantas de tomateiro apresentam maior resposta de produção sob solução nutritiva com NO_3^- ; porém, também é evidente como alterações na percepção do etileno permitem à planta assimilar melhor o N, independente da fonte.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. Amônio. Eficiência no uso de nitrogênio. Nitrato
Percepção de etileno.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is the nutrient that most limits the growth and productivity of agricultural crops. Ethylene is a phytohormone that plays an important role in the integration of events related to plant growth and development. Although some degree of interaction between N and ethylene has already been demonstrated, further details of the physiology of plants under conditions of nutritional stress due to variation in the N source and alteration in the metabolism of this hormone are still scarce. In the present work, tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom, wild type - WT) were used as control, and its hormonal mutant *Never ripe* (Nr), which is insensitive to ethylene, grown in nutrient solution with different sources of N (ammonium - NH_4^+ and nitrate - NO_3^-) and a mixture between the two sources, in a factorial 2 (genotypes) x 3 (N sources). In order to understand the interaction between sources of N and the perception of ethylene, parameters of growth, photosynthesis, levels of biochemical markers, levels of total N and concentrations of NH_4^+ and NO_3^- were evaluated during the experiment. The growth parameters were significantly altered in relation to the plants treated with 100% NH_4^+ and 100% NO_3^- in Nr, which better assimilated these N sources, with increased growth and production compared to WT. As for photosynthesis parameters, mainly in photochemistry, photosystem damage occurs when control plants are subjected to 100% NH_4^+ ; on the other hand, Nr in relation to the WT genotype showed a clear tolerance to this nutritional stress. Several differences were found in the biochemical parameters in relation to the plants treated with NH_4^+ and NO_3^- sources, in interaction with the hormonal alteration, justifying that the mutant shows its greater productivity and growth using the 100% NO_3^- source. The data found here confirm that tomato plants have a higher production response at 100% NO_3^- ; however, it is also evident how alterations in the perception of ethylene allow the plant to better assimilate this element in both sources.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; Ammonium. Nitrogen use efficiency. Nitrate. Perception of ethylene.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	O tomateiro como modelo de estudos biológicos.....	11
2.2	Mutantes hormonais em tomateiro	11
2.3	O mutante hormonal de tomateiro <i>Never ripe (Nr)</i>	11
2.4	Sinalização de etileno	12
2.5	Nitrogênio em plantas.....	13
2.6	Transporte de nitrato em plantas	14
2.7	Efluxo de nitrato das raízes	14
2.8	Assimilação de amônio.....	15
3.	OBJETIVOS	16
3.1	Objetivo geral	16
3.2	Objetivos específicos	16
4.	METODOLOGIA.....	17
4.1	Material vegetal e condições experimentais	17
4.2	Determinação dos parâmetros de crescimento e produtividade	18
4.3	Análises de parâmetros fisiológicos	19
4.4	Análises bioquímicas foliares	19
4.5	Quantificação do N e NH_4^+ e NO_3^- endógenos.....	20
4.6	Análise de dados	21
5.	RESULTADOS	22
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÕES.....	34
8.	REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) está entre os elementos minerais exigidos em maior quantidade pelas plantas. Cerca de 1-5% da matéria seca total da planta consiste em N, sendo este elemento um constituinte integral de proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, coenzimas, fitormônios e metabólitos especializados (Li *et al.*, 2020). A disponibilidade e a forma como o N é absorvido pelas raízes é um fator decisivo para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Hawkesford *et al.*, 2023). Além disso, apenas cerca de 50% do fertilizante nitrogenado aplicado é utilizado pelas culturas no primeiro ano após sua aplicação (Jensen *et al.*, 2011). O restante é incorporado a compostos orgânicos no solo ou perdido para o meio ambiente. O N perdido do sistema planta-solo na forma de nitrato (NO_3^-) pode resultar na poluição de corpos de água, enquanto as emissões gasosas na forma de amônia (NH_3), óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) contribuem para a poluição atmosférica e o aquecimento global (Thompson *et al.*, 2019).

O amônio (NH_4^+) e NO_3^- são as duas principais formas de N que podem ser utilizadas pelas plantas (Hobbie *et al.*, 2012). O NH_4^+ absorvido pelas raízes é assimilado ou armazenado em vacúolos nas raízes ou é transportado para as partes aéreas. Geralmente, assume-se que o NH_4^+ não é usado para o transporte de N a longa distância dentro da planta; no entanto, a concentração de NH_4^+ no xilema pode estar numa faixa de mM (Yuan *et al.*, 2007). O NO_3^- possui menor interação com as partículas do solo, isso implica em maior mobilidade do NO_3^- no solo frente ao NH_4^+ e, portanto, maior disponibilidade para as plantas (Wang *et al.*, 2018). Além disso, a reação de nitrificação mediada pelas bactérias do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* converte NH_4^+ a NO_3^- em algumas horas, o que aumenta a oferta de NO_3^- para os vegetais (Kentaro *et al.*, 2022)

Algumas espécies exibem uma preferência na forma de N a ser absorvido, o que é frequentemente mostrado através de maior produção de biomassa e acúmulo de nutrientes (Britto *et al.*, 2013). Os mecanismos fisiológicos que resultam na preferência de formas específicas de N pelas plantas ainda não são bem compreendidos, mas as condições ambientais (disponibilidade de N no solo, pH, temperatura, umidade etc.) influenciam na preferência de absorção de N e já foram relatadas para várias espécies de plantas (Harrison *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015). Evidências indicam que as diferentes fontes e proporções de N afetam taxa de absorção deste elemento, alterando assim o crescimento e a produtividade (Hachiya *et al.*, 2017).

A disponibilidade de fontes de N no solo varia substancialmente no tempo e no espaço, dependendo das propriedades do solo, como textura, pH, umidade e atividade microbiana

(Walch *et al.*, 2006). Como consequência, as plantas desenvolveram mecanismos para modificar sua eficiência de aquisição de N em resposta à disponibilidade e à forma do N externo, bem como, à demanda de N da planta (Forde *et al.*, 2002; Hawkesford & Riche, 2020; Xu & Takahashi, 2020). Dessa maneira, adicionar uma proporção apropriada de NH_4^+ e NO_3^- pode melhorar o desempenho das culturas.

O etileno é um fitormônio que regula uma variedade de processos de crescimento e desenvolvimento da planta, senescência e resposta ao estresse (Ainda *et al.* 2023). Sob vários estressores abióticos, o etileno controla as reações redox para apoiar o crescimento e desenvolvimento da planta (Suhel *et al.*, 2023). ACC (ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico) sintase (ACS) é uma enzima chave imperativa da via de biossíntese de etileno (Houben *et al.*, 2019). Inibidores de etileno foram estudados para substanciar a resposta etileno na tolerância ao estresse abiótico por seu papel potencial no bloqueio da síntese e ação do etileno (Ansari *et al.*, 2019).

Estudos anteriores ressaltaram a existência de uma estreita relação entre o N e etileno em plantas, onde mudanças na disponibilidade ou formas de N alteraram a biossíntese ou a inibição desse fitohormônio (Khan *et al.*, 2015). O sinal de etileno disparado por N regula uma gama de respostas adaptativas morfofisiológicas, incluindo a modulação do sistema radicular, absorção e translocação de N, toxicidade de NH_4^+ , acúmulo de antocianina e senescência prematura (Ma *et al.*, 2022). Plantas modelo são usadas para entender fenômenos biológicos, permitindo que essa informação seja estendida a outros organismos, geralmente são pequenas em tamanho, têm um ciclo de crescimento curto e requerem uma estrutura mínima para crescer (Bauchet & Causse, 2012). O presente trabalho analisou as respostas fisiológicas e nutricionais em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) submetidas a diferentes fontes de N (NH_4^+ e NO_3^-) nos genótipos tipo selvagem (WT) e em seu mutante hormonal *Never ripe* (*Nr*). A hipótese do nosso trabalho centrou-se em analisar se existe ou não relação entre o metabolismo do nitrogênio e a percepção do etileno, nos processos de crescimento e produção do tomateiro. Para verificar isso, nossos objetivos foram avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas com diminuição da percepção de etileno, submetidas a diferentes fontes de nitrogênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O tomateiro como modelo de estudos biológicos

As plantas, como outros biosistemas, são sistemas altamente complexos e dinâmicos. Estudar o crescimento e desenvolvimento vegetal é um grande desafio para os cientistas, que estão progressivamente aprimorando modelos e gerando novos modelos para uma grande variedade de aplicações. O tomateiro tem sido descrito como um excelente modelo vegetal para o estudo de processos biológicos (Pailles *et al.*, 2020). O tomate tem um genoma relativamente pequeno ($7,1 \times 10^8$ pares de bases) e poucas sequências de DNA repetitivas, características que facilitam o conhecimento das estruturas genômicas (Lima *et al.*, 2004). Além disso, é uma espécie amplamente cultivada e de grande importância econômica.

2.2 Mutantes hormonais em tomateiro

Os fitormônios, ou hormônios vegetais, são de grande importância para o desenvolvimento das plantas. Auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno são os cinco principais (e mais estudados) fitormônios e controlam vários estágios de desenvolvimento (Lee *et al.*, 2019) desde a divisão celular e diferenciação até o amadurecimento e senescência do fruto (Pattyn *et al.*, 2021).

O uso de mutantes para estudos de desenvolvimento tornou-se uma ferramenta muito importante, amplamente utilizada nos últimos anos (Mao *et al.*, 2019). No entanto, existem poucos estudos que relacionam as respostas a estresses nutricionais com diferentes fitormônios. Os mutantes do tomate podem ser usados como uma ferramenta eficaz em estudos genéticos para entender os genes e suas funções (Nascimento *et al.*, 2021). Poucas mutações foram bem caracterizadas no nível fisiológico dessas espécies, embora tenham sido identificadas por muitas décadas. Entre as diversas mutações já descritas em tomate, existem as alterações no metabolismo de percepção/sensibilidade às auxinas (Bradford, 1986), ao ácido abscísico (Taylor *et al.*, 2000), às giberelinas (Koornneef *et al.*, 1990) e ao etileno (Wilkinson *et al.*, 1995)

2.3 O mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)*

Fitormônios como o etileno desempenham um papel importante nas vias de transdução de sinal, permitindo que as plantas respondam ao estresse (Yadav *et al.*, 2023). Mutantes hormonais em tomateiro são frequentemente usados para demonstrar ou excluir interações entre as vias de transdução de sinal de alguns fatores ambientais (Gratão *et al.*, 2009). Entretanto

pouco se sabe sobre como estes se relacionam com fatores nutricionais e o impacto dessa interação no metabolismo e na produção.

Seis receptores de etileno, SIETR1 a SIETR6, foram caracterizados em plantas de tomate (Klee, 2002). No caso do mutante *Never ripe (Nr)*, foi identificado como SIETR3 (Klee, 2002). Esta mutação ocorre, pois há uma única substituição de aminoácidos dentro do domínio sensor na proteína Nr-SIETR3 que impede a ligação do etileno e, assim, impede a sua cascata de sinalização (Lanahan *et al.*, 1994; Wilkinson *et al.*, 1995). A expressão de ETR1 em levedura mostra que os primeiros 165 aminoácidos são necessários e suficientes para a ligação do etileno (Schaller, 1995). A ligação do etileno ao receptor é mediada pelo cofator cobre (Cu). Os mutantes que não apresentam a ligação ao cofator Cu não percebem etileno. O receptor também apresenta forte afinidade pela prata (Ag), que é amplamente utilizada como inibidor da captação de etileno e atua no complexo receptor deslocando o Cu do sítio ativo (Rodriguez *et al.*, 1999).

O mutante *Nr* tem amadurecimento incompleto do fruto devido à baixa sensibilidade ao etileno, de modo que o fruto pode apresentar pigmentação amarela a vermelha escura, mas não há degradação da parede celular, nem alteração na maciez e nem aumento na síntese de açúcares, fatores que caracterizam o amadurecimento dos frutos (Wilkinson *et al.*, 1995). Além disso, em condições ótimas de cultivo o mutante *Nr* apresenta maior crescimento e produtividade por causa de alterações como aumento nas taxas fotossintéticas e alterações no curso diário de carboidratos foliares (Nascimento *et al.*, 2021).

2.4 Sinalização de etileno

O etileno se difunde rapidamente e desempenha um papel importante na integração de eventos relacionados ao desenvolvimento da planta, como germinação de sementes, amadurecimento de frutos, abscisão e senescência, e na resposta à fatores externos, como estresses bióticos e abióticos (Khan *et al.*, 2017; Francini e Ferrante, 2023). A senescência foliar é um processo autocatabólico regulado pela rede gênica durante o estágio final de crescimento e desenvolvimento da planta, impactando na biomassa e na produtividade da planta (Song *et al.*, 2022). A rede de senescência foliar de plantas é regulada por vários hormônios, incluindo o etileno, e outros sinais ambientais (Li *et al.*, 2013). Há muito tempo se considera que o etileno acelera significativamente a senescência foliar, na qual o dímero EIN3/EIL1 desempenha o papel de fator transcricional central (Koyama, 2014; Burg, 1968). Outras proteínas podem reduzir a atividade transcricional de EIN3/EIL1. Este mecanismo de regulação negativa faz parte da existência e função das folhas no crescimento e desenvolvimento normal das plantas

(Li *et al.*, 2013). O sinal de etileno é mediado por um sistema complexo. Resumidamente, o etileno é percebido pelo componente receptor ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1), que funciona como um regulador negativo das respostas ao etileno, e então atua através da CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) para passar o sinal para ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2) (Lin *et al.*, 2009; Ceusters e Van de Poel, 2018). No final da via de sinal, a resposta ao etileno é mediada por fatores de transcrição, incluindo ETILENO INSENSITIVO 3 (EIN3) e FATORES DE RESPOSTA AO ETILENO (ERFs) (Ceusters e Van de Poel, 2018).

2.5 Nitrogênio em plantas

A disponibilidade de fontes de N no solo varia substancialmente no tempo e no espaço, dependendo das propriedades do solo, como textura, pH, umidade e atividade microbiana (Walch *et al.*, 2006). Como consequência, as plantas desenvolveram mecanismos para modular sua eficiência de aquisição de N em resposta à disponibilidade e forma de N externo, bem como à demanda de N da planta (Forde, 2002; Hawkesford Riche, 2020; Xu & Takahashi, 2020). Isso inclui ter vários sistemas de transporte de N que medeiam a absorção em diferentes concentrações externas. Além disso, as plantas podem alterar a arquitetura do sistema radicular em resposta à disponibilidade de nutrientes para otimizar a exploração de um determinado volume de solo ou promover a exploração de um volume maior. A absorção de NO_3^- e NH_4^+ pelas raízes das plantas é mediada por proteínas transportadoras localizadas na membrana plasmática das células epidérmicas e corticais das raízes. Esses sistemas de transporte medeiam a absorção de NO_3^- ou NH_4^+ com diferentes afinidades. Os sistemas de transporte de alta afinidade (HATS) operam em baixas concentrações (0,5 mM) de NO_3^- externo ou NH_4^+ . Em concentrações mais altas (0,5 mM), a absorção ocorre principalmente por meio dos sistemas de transporte de baixa afinidade (LATS). Ambos os sistemas de captação têm componentes induzíveis e constitutivos (Wang *et al.*, 2014).

Em geral, para alcançar crescimento, desenvolvimento e reprodução eficientes, as plantas requerem quantidades adequadas, mas não excessivas, de N (Liu *et al.* 2020). Portanto, a baixa disponibilidade de N no solo ou um declínio na capacidade de absorção pelas raízes afeta negativamente a produtividade das plantas e a competitividade ecológica. Plantas deficientes em N são tipicamente atrofiadas, com folhas estreitas (Liu *et al.* 2020). A clorose causada pela deficiência de N geralmente começa nas folhas mais velhas quando o N é

remobilizado para as folhas mais novas. Culturas deficientes em N aparecem em verde pálido ou amarelo. e, eventualmente, necrose foliar e morte da planta (Esteban *et al.* 2016).

2.6 Transporte de nitrato em plantas

Existem dois tipos de transportadores envolvidos na absorção de NO_3^- pela raiz. Esses transportadores pertencem às famílias NPF (NRT1/PTR; transportador de NO_3^- 1/transportador de peptídeo) ou NRT2 (transportador de NO_3^- 2). Geralmente, assume-se que os transportadores NPF (NRT1/PTR) e NRT2 medeiam o transporte de baixa e alta afinidade de NO_3^- para as raízes, respectivamente, com exceção de NPF6.3 (NRT1.1) que pode exibir afinidade alta e baixa (Wang *et al.*, 2018).

Independentemente do tipo de transportador de NO_3^- , o transporte interno através da membrana plasmática ocorre contra um forte gradiente de potencial eletroquímico, uma vez que o NO_3^- tem que superar tanto o potencial negativo da membrana plasmática quanto o gradiente de concentração ascendente. O influxo de NO_3^- , portanto, requer energia metabólica. Os transportadores das famílias NPF (NRT1/PTR) e NRT2 transportam NO_3^- através da membrana plasmática em simporte com prótons (H^+), o que, por sua vez, requer o gasto de trifosfato de adenosina (ATP) pela H1-ATPase para extrusão de H^+ , para manter o gradiente de H^+ através da membrana plasmática (Hawkesford *et al.*, 2023)

2.7 Efluxo de nitrato das raízes

A importância fisiológica do efluxo de NO_3^- permanece incerta, mas o processo pode desempenhar um papel na detecção da disponibilidade de NO_3^- , fornecendo uma regulação dinâmica e flexível da homeostase do NO_3^- citosólico (Miller *et al.*, 2008) e absorção líquida de NO_3^- (influxo menos efluxo). Em condições de baixo NO_3^- externo, tanto o gradiente químico quanto o gradiente elétrico favorecem o efluxo passivo de NO_3^- do citosol através da membrana plasmática (Miller *et al.*, 1996). Embora esse gradiente favorável esteja presente por muitas horas após a privação de N, o processo de efluxo diminui e é abolido após algumas horas, sugerindo que, na ausência de NO_3^- externo, o efluxo de NO_3^- é regulado negativamente (Van der Leij *et al.*, 1998).

Em contraste com o NH_4^+ que é predominantemente incorporado em compostos orgânicos na raiz, o NO_3^- é mais facilmente distribuído por toda a planta. O NO_3^- é acumulado e pode ser armazenado nos vacúolos das raízes, brotos e órgãos de armazenamento (Rossato *et*

al., 2001). O NH_4^+ está em equilíbrio com o NO_3^- que é uma base fraca com um pKa de 9,25. O pH do solo é geralmente consideravelmente mais baixo do que este pKa e, portanto, muito pouco NO_3^- está presente no solo. Assim, NH_4^+ é a principal forma assimilada pelas raízes (Loqué, 2004).

2.8 Assimilação de amônio

O NH_4^+ é um intermediário central no metabolismo do N nas plantas. Além da absorção do solo pelas raízes, o NH_4^+ é constantemente gerado nos tecidos vegetais por processos como redução de NO_3^- , fotorrespiração, biossíntese de lignina, remobilização de N induzida por senescência e fixação de N_2 em leguminosas (Joy, 1988). Independentemente da origem do NH_4^+ ou do órgão em que é assimilado (raízes, nódulos radiculares e folhas), as principais enzimas envolvidas são a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT; glutamina-oxoglutarato aminotransferase).

A assimilação de NH_4^+ nas raízes demanda uma grande necessidade de esqueletos de carbono (C) para a síntese de aminoácidos. Esses esqueletos de C são fornecidos pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) na mitocôndria, e os intermediários removidos devem ser repostos pelo aumento da atividade da PEP (fosfoenolpiruvato) carboxilase. Em comparação com o suprimento de NO_3^- , a fixação líquida de C em raízes supridas com NH_4^+ é várias vezes maior (Viktor e Cramer, 2005). Entretanto, a influência da fonte de N no crescimento e produção de plantas depende de muitos fatores. Geralmente, plantas adaptadas a solos ácidos (espécies calcífugas) ou com baixo potencial redox (por exemplo, zonas úmidas) preferem NH_4^+ (Lee, 1999). Por outro lado, plantas adaptadas a solos calcários de alto pH (espécies calcícolas) utilizam preferencialmente NO_3^- . Além disso, é importante considerar que o melhoramento vegetal das espécies cultivadas, em geral, ocorreu em ambientes distintos do centro de diversidade das espécies. Como resultado, as maiores taxas de crescimento e rendimentos de plantas cultivadas são obtidas pelo fornecimento combinado de NH_4^+ e NO_3^- .

Para a maioria das plantas o fornecimento único de N via NH_4^+ é tóxico. Os sintomas da toxicidade do NH_4^+ incluem clorose foliar e crescimento atrofiado. As espécies vegetais diferem na tolerância ao NH_4^+ (Britto e Kronzucker, 2002). Entre as plantas cultivadas, a cevada (*Hordeum vulgare*) é sensível ao NH_4^+ , enquanto o arroz (*Oryza sativa*) é tolerante ao NH_4^+ .

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar os mecanismos morfofisiológicos e bioquímicos relacionados com a interação entre diferentes fontes de N (NO_3^- e NH_4^+) e a redução na percepção de etileno em plantas de tomate *Never ripe* e como esses fatores influenciam no crescimento e na produção.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os parâmetros biométricos (crescimento, produção e partição de biomassa) de plantas de tomateiro com alterações na percepção do etileno submetidas à diferentes fontes de N.
- Relacionar os impactos que gera uma alteração hormonal (falta de percepção) no metabolismo de C e N, submetendo plantas a diferentes formas de assimilação do N.
- Caracterizar os aspectos fotossintéticos (trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*) de plantas de tomateiro com alterações na percepção do etileno submetidas à diferentes fontes de N.
- Comparar a eficiência de absorção e assimilação de diferentes fontes de N em plantas com falta de percepção de etileno.

4. METODOLOGIA

4.1 Material vegetal e condições experimentais

O estudo foi realizado na Sala de Crescimento Vegetal do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia - Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras-MG, entre outubro de 2022 e março de 2023. As câmaras de crescimento possuíam espaço, ventilação e sistema de abastecimento de água. Foram utilizadas plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) tipo selvagem (WT) e seu mutante isogênico insensível ao etileno devido à perda de função do receptor SIETR3 - *Never ripe* (*Nr*). As sementes foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 5% por 10 min, em seguida lavadas com água destilada corrente, posteriormente colocadas em placas de Petri com papel de germinação. As sementes foram mantidas em câmaras de crescimento com temperatura média de 25 °C, fotoperíodo de 12h/12h e mínimo de 400 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossintética ativa, diariamente foram irrigadas até sete dias após a germinação (aparecimento da primeira folha verdadeira), as mudas foram transferidas para vasos de 400 mL contendo areia previamente lavada e autoclavada

Posteriormente, foi iniciada a aplicação de tratamentos por meio de fertirrigação. Duas soluções nutritivas foram modificadas, uma delas contendo apenas NO_3^- , como fonte de N, e a outra apenas NH_4^+ ; finalizando com a preparação de uma terceira solução que combinava essas duas fontes de N (o preparo destas soluções nutritivas foi baseado nos protocolos descritos por Hoagland e Arnon, 1950). A primeira fertirrigação foi realizada com $\frac{1}{2}$ força iônica, completando-a após 7 dias. A adubação foi realizada semanalmente com 50 mL de solução nutritiva ($\text{pH } 5,5 \pm 0,5$). Foram realizadas irrigações diárias com 20 mL de água destilada exceto dois dias antes de cada aplicação semanal, periodicamente foram realizadas lavagens no substrato com aproximadamente 0,5 L de água destilada para forçar a lixiviação e evitar o acúmulo de íons na areia. Os valores das concentrações de cada nutriente nas soluções nutritivas, são apresentados abaixo (**Tabela 1**); concentrações de reagentes nos tratamentos para 1 L de solução nutritiva.

Tabela 1. Concentrações de nutrientes nas soluções nutritivas com diferentes fontes de nitrogênio.

Reagentes	Controle	Nitrato	Amônio	ml de SE p/ 1L da SN
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1mM	1mM		C: 4; Nitr: 4; Amônio: 0
KNO ₃		1mM		C: 0; Nitr: 6; Amônio: 0
NaNO ₃		1mM		C: 0; Nitr: 2; Amônio: 0
Na ₂ SO ₄	1mM	1mM		C: 1; Nitr: 1; Amônio: 0
KCl	1mM	1mM	1mM	C: 8; Nitr: 2; Amônio: 5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1mM	1mM	1mM	C: 1; Nitr: 1; Amônio: 1
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1mM	1mM	1mM	C: 2; Nitr: 2; Amônio: 1
NH ₄ Cl	4mM		4mM	C: 2; Nitr: 0; Amônio: 4
KH ₂ PO ₄			1mM	C: 0; Nitr: 0; Amônio: 2
CaCl ₂ .2H ₂ O			1mM	C: 0; Nitr: 0; Amônio: 4
K ₂ SO ₄			1mM	C: 0; Nitr: 0; Amônio: 1
MnSO ₄ .H ₂ O	0,002 mM	0,002 mM	0,002 mM	Micronutrientes: 2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,002 mM	0,002 mM	0,002 mM	Micronutrientes: 2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005 mM	0,005 mM	0,005 mM	Micronutrientes: 2
FeSO ₄ .7H ₂ O – Na ₂ EDTA	0,064 mM	0,064 mM	0,064 mM	Micronutrientes: 3
H ₃ BO ₃	0,025 mM	0,025 mM	0,025 mM	Micronutrientes: 2
Na ₂ MoO ₄	0,005 mM	0,005 mM	0,005 mM	Micronutrientes: 2

Fonte: Do autor (2023).

4.2 Determinação dos parâmetros de crescimento e produtividade

Para quantificar os parâmetros biométricos ao final do experimento, foram selecionadas 6 repetições (plantas) por tratamento em cada um dos genótipos testados. O número de folhas, comprimento da raiz, altura da planta, número e peso dos frutos foram medidos e a área foliar foi calculada usando ImageJ software (versão 1.52a) (Schneider et al. 2012). Os diferentes órgãos vegetais (folhas, caule, raízes e frutos) foram armazenados em sacos de papel e secos em estufa a 65 °C até atingirem peso constante, para determinação da massa seca em balança analítica. A partir destes dados foram foi determinada a razão raiz: parte aérea (massa seca da raiz / massa seca da parte aérea; g g⁻¹) e a área foliar específica (AFE) utilizando a fórmula AFE (cm² g⁻¹) = área foliar total/ massa seca foliar (Hunt, 1982).

4.3 Análises de parâmetros fisiológicos (trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*)

As taxas de assimilação líquida de CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$), eficiência no uso da água ($A/E - E_{UA}$, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) foram obtidas utilizando-se um analisador de gases no infravermelho (IRGA), modelo LI-6400XT (LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LI-COR). As medições foram realizadas cerca de 40 dias após o transplante (estágio vegetativo), das 10h00 às 12h00 sob luz saturante artificial de 1.000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração fixa de CO₂ de 400 μmol .

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas utilizando um fluor\u00f4metro port\u00e1til MINI-PAM (Walz Inc). Ap\u00f3s 30 min de adapta\u00e7\u00e3o ao escuro, foram obtidos os par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia basal (F_0), fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) e rendimento qu\u00e2ntico potencial (F_v/F_m) do fotossistema II (FSII). Al\u00e9m disso, foram determinados os coeficientes de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (q_P) e extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o fotoqu\u00edmica (NPQ), bem como, a taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR) (Martins *et al.*, 2014)

4.4 An\u00e1lises bioqu\u00edmicas foliares

As coletas para as an\u00e1lises bioqu\u00edmicas foram realizadas entre 35-40 dias ap\u00f3s a aplica\u00e7\u00e3o dos tratamentos, com as plantas no per\u00edodo vegetativo. Foram coletadas folhas totalmente expandidas, as mesmas folhas em que foi feita a quantifica\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia e assimila\u00e7\u00e3o de CO₂. Todo o material vegetal foi posteriormente congelado em nitrog\u00eanio l\u00edquido (Nliq) e, em seguida, armazenado em ultrafreezer -80 \u00b0C at\u00e9 o momento das an\u00e1lises. Amostras foliares foram submetidas \u00e0 extra\u00e7\u00e3o etan\u00f3lica a quente, determinando-se, na fra\u00e7\u00e3o sol\u00favel em etanol, os a\u00e7\u00facares redutores e n\u00e3o-redutores, amino\u00e1cidos sol\u00faveis totais, e teores de pigmentos fotossint\u00e9ticos (clorofilas *a* e *b*, e carotenoides), enquanto na fra\u00e7\u00e3o insol\u00favel os teores de amido e prote\u00ednas. A quantifica\u00e7\u00e3o dos a\u00e7\u00facares redutores foi feita por meio do m\u00e9todo DNS, proposto por Miller (1959) e os a\u00e7\u00facares sol\u00faveis totais pelo m\u00e9todo de antrona, descrito por Dische (1962). A quantifica\u00e7\u00e3o de amino\u00e1cidos foi realizada pelo m\u00e9todo de ninidrina conforme o descrito por Yemm e Cocking (1955). Para os teores dos pigmentos fotossint\u00e9ticos, foi adicionado 120 μL de etanol absoluto a 50 μL do extrato etan\u00f3lico. O c\u00e1lculo dos teores de clorofila e carotenoides, expressos por mg g^{-1} de massa fresca (MF), foi feito de acordo com as equa\u00e7\u00f5es (Equa\u00e7\u00f5es 1 a 3) de Lichtenthaler (2001):

Equação 1:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg-g}^{-1}\text{)} = 13.36 \times A_{663} - 1.28 \times A_{647}$$

Equação 2:

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg-g}^{-1}\text{)} = 27.43 \times A_{647} - 2.72 \times A_{663}$$

Equação 3:

$$\text{Carotenoides (mg g}^{-1}\text{)} = (1000 \times A_{470} - 2.13 \times \text{Clorofila } a - 97.64 \times \text{Clorofila } b) / 209$$

Para a determinação da proteína, a fração insolúvel (precipitado) da extração etanólica foi solubilizado com NaOH (0,1M) e encubado à 80 °C por 1h, o sobrenadante resultante foi utilizado para quantificação pelo protocolo Bradford (1976). A extração do amido foi a partir da amostra derivada da extração de proteínas, na qual foi adicionado tampão acetato de potássio, para a acidificação do meio, seguido da adição da solução de degradação (tampão acetato de potássio mais a enzima amiloglucosidase) (adaptado de Hendriks *et al.*, 2003 e Zanandrea *et al* 2010). Para a extração da sacarose (açucars não-redutores) foi adicionado hidróxido de potássio (KOH) ao extrato etanólica (1:1). A quantificação do amido e sacarose se deu pelo método de antrona (Dische,1962). A leitura da absorbância das amostras, com comprimento de onda definido de acordo com cada protocolo citado anteriormente, foi feita utilizando-se um leitor de microplacas modelo Epoch com a interface do software Gen5 (Bio Tek Instruments, Inc., Vermont, USA).

4.5 Quantificação do N e NH₄⁺ e NO₃⁻ endógenos

As amostras vegetais (folhas, caule e raiz) foram armazenadas em sacos de papel e secas a 65°C em estufa por pelo menos 48 horas, até atingirem peso constante, e posteriormente, reduzidos a pó por meio de um moinho CIENLAB CE-430; 8 lâminas, 1.725 rpm, 20 mesh. Para determinar os teores de N total em todas as amostras, foi utilizado o método de Kjeldahl, utilizando solução digestora com ácido sulfúrico, alteração controlada de temperatura no bloco digestor, seguido de destilação, com hidróxido de sódio, e a titulação, com ácido clorídrico, até alteração de cor da solução (coloração verde para rosa). O volume gastado de ácido clorídrico na titulação foi utilizado para o cálculo da porcentagem de N na amostra vegetal (Feema, 1983).

Para a extração do NH₄⁺ foi utilizado 60 mg de massa fresca para cada amostra previamente triturada em Nliq, posteriormente estas amostras foram transferidas para um

microtubo de 3 mL, foram colocados 1500 µL de água ultrapura, ficaram incubando por um período de 10 min em banho-maria e centrifugação a 4.000 rpm e 4°C por 20 min. O sobrenadante bruto foi coletado e a quantificação iniciada tomando 100 µL de extrato solúvel aos quais 500 µL de uma primeira mistura de solução contendo (48,29 mM fenol; 0,077 µM nitroprussiato de sódio) e mais 500 µL de uma segunda mistura de solução contendo (56,81 mM NaOH; 0,068 M Na₂HPO₄ 2H₂O 27% NaOCl) em seguida, as amostras foram incubadas por 60 min a 37 °C, e a leitura foi realizada em uma absorvância de 630 nm (McCullough, 1967).

Para a extração do NO₃⁻ utilizou-se 20 mg de massa seca para cada amostra, aos quais foram adicionados 10 mL de água deionizada, procedeu-se a incubação por 1h a 45°C em banho-maria, em seguida as amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 15 min, o sobrenadante bruto foi removido e procedeu-se à quantificação, retirando 20 µL de extrato solúvel e adicionando 200 µL de SA-H₂SO₄ – mix 5%, 16,7 µL KNO₃ as amostras foram deixadas por 20 min em reação, depois disso Ao mesmo tempo, 4,75 µL de NaOH foi colocado, uma vez que as amostras esfriaram, a leitura foi realizada em uma absorvância de 410 nm (Cataldo et al., 1975).

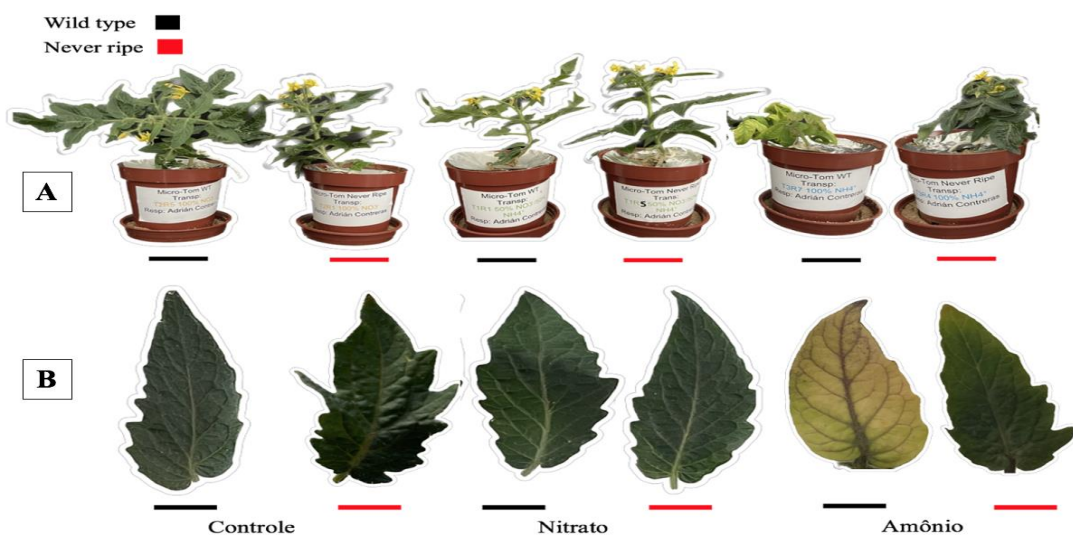
4.6 Análise de dados

A análise estatística foi realizada seguindo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em fatorial simples 3 (fontes de N) x 2 (genótipos), totalizando 6 tratamentos, com no mínimo 6 repetições (plantas) por tratamento. Os dados obtidos foram analisados pelo software R, versão 4.0.0 (R Core Team, 2020). As características avaliadas foram submetidas a análise da variância (ANOVA) pelo Teste F, quando houve efeito significativo nos parâmetros analisados foi aplicado o Teste Tukey ($p \leq 0,05$), no pacote ExpDes.pt (Ferreira *et al.*, 2013). Todas as figuras foram feitas no pacote ggplot2 (Wickham, 2016).

5. RESULTADOS

Em relação aos parâmetros de crescimento e como as plantas respondem a diferentes fontes de N, os resultados mostraram que plantas de tomateiro apresentam maior afinidade pelo NO_3^- em relação ao NH_4^+ como fonte única de N em ambos os genótipos avaliados (**Figuras 1 e 2**). Também foram observadas respostas significativas em parâmetros específicos, como a altura das plantas (**Figura 2A**), em cada uma das fontes de N e nos genótipos estudados, sendo evidente uma diminuição significativa quando as plantas assimilavam apenas o NH_4^+ como fonte de N. A fonte de N também influenciou a produtividade das plantas (**Figura 2B**), sendo observada uma maior produção no tratamento com NO_3^- . Os valores de massa seca total (**Figura 2C**) refletem uma resposta maior por parte das plantas do genótipo mutante *Nr* em ambas as fontes estudadas, em comparação com o WT. Em relação aos valores da razão raiz: parte aérea (**Figura 3D**), eles demonstram melhor utilização do NO_3^- em comparação ao NH_4^+ como fontes de N, porém, pouca alteração foi observada nessa variável, o que nos indica que houve uma proporcionalidade na redução do crescimento das plantas.

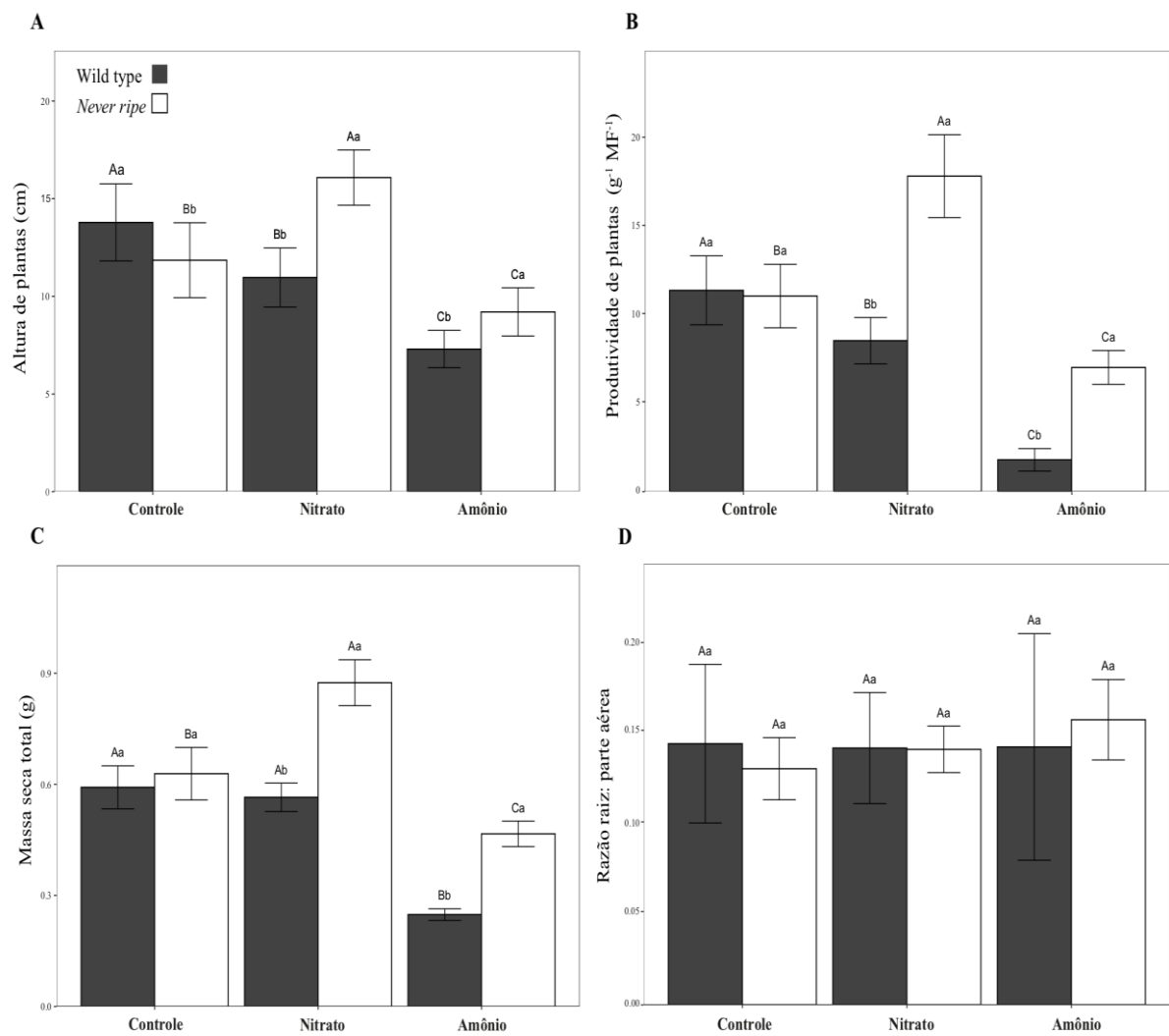
Figura 1. Plantas de mesmo estágio fenológico dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+) (**A**). Folíolos no mesmo estágio fenológico de plantas dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+) (**B**). As barras horizontais (preta – WT e vermelha – *Never ripe*) indicam os genótipos avaliados.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 2. Altura de plantas (cm) (**A**), produtividade de plantas (g de frutos g^{-1} de massa total) (**B**), massa seca total (g) (**C**) e razão raiz: parte aérea (**D**) em plantas dos genótipos WT e *Never*

ripe nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+). O genótipo selvagem (WT) é representado por barras cinzas à esquerda, enquanto o genótipo mutante *Never ripe* é representado por barras brancas à direita. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$). Letras maiúsculas iguais indicam que não há distinção entre as fontes de N, enquanto letras minúsculas iguais indicam que não há distinção entre os genótipos estudados ($p > 0,05$), calculadas pelo teste de Tukey.



Fonte: Do autor (2023).

De forma complementar e evidenciando ainda mais a influência de um determinado genótipo e fonte de N no metabolismo das plantas, são apresentados outros dados de crescimento e produtividade, tais como: comprimento da raiz, massa seca do caule, massa seca da raiz, número de folhas, AFE e número de frutos, que demonstram uma clara tendência de

melhor assimilação do NO_3^- em relação ao NH_4^+ (**Tabela 2**). Certos parâmetros como comprimento de raiz e número de frutos mostram uma melhor resposta no mutante *Nr* em comparação ao WT (**Tabela 2**).

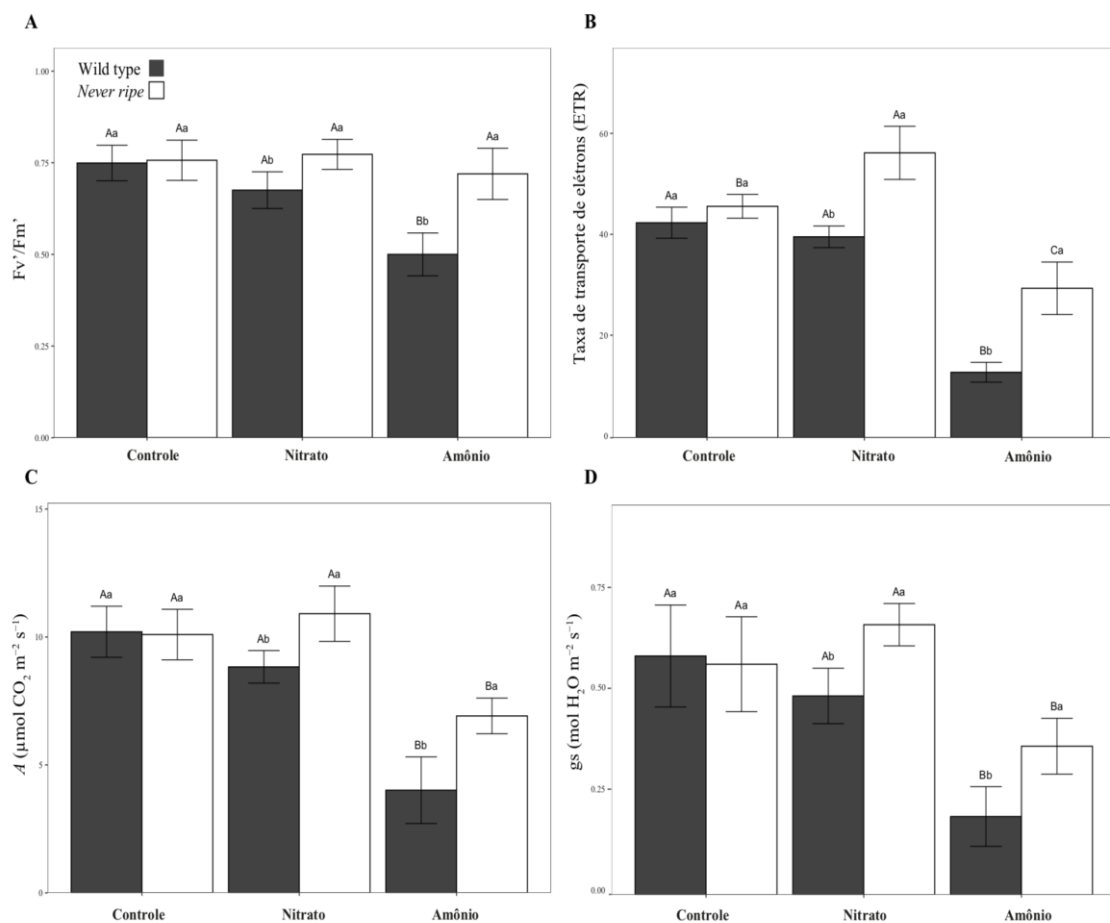
Tabela 2. Comprimento de raiz (cm), massa seca de raiz (g), de caule (g), de folhas (g) e total (g), bem como área foliar específica, área foliar total e número de frutos em plantas dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+).

Parametros	Wild type			<i>Never ripe</i>		
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	Controle	NO_3^-	NH_4^+
Comprimento de raiz (cm)	14.0 ± 1.9 Aa	14.1 ± 1.5 Ab	6.8 ± 0.9 Bb	13.6 ± 1.9 Ba	18.6 ± 1.41 Aa	10.0 ± 1.2 Ca
Massa seca de raiz (g)	0.07 ± 0.02 Aa	0.07 ± 0.01 Ab	0.03 ± 0.01 Bb	0.07 ± 0.01 Ba	0.10 ± 0.002 Aa	0.06 ± 0.01 Ba
Massa seca de caule (g)	0.13 ± 0.01 Aa	0.11 ± 0.01 ABb	0.08 ± 0.009 Ba	0.14 ± 0.03 Ba	0.22 ± 0.03 Aa	0.10 ± 0.01 Ca
Numero de Folhas	14.6 ± 2.1 Aa	14.1 ± 2.3 Ab	5.5 ± 2.4 Bb	15.1 ± 1.4 Aa	16.1 ± 1.9 Aa	11.5 ± 1.5 Ba
Área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	1.1 ± 0.14 Aa	1.53 ± 0.50 Ab	0.46 ± 0.11 Ba	1.15 ± 0.48 Ba	2.36 ± 0.27 Aa	0.74 ± 0.17 Ba
Área foliar total ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	116.6 ± 3.8 Aa	117.3 ± 4.2 Ab	69.8 ± 12.0 Bb	122.2 ± 14.0 Ba	155.6 ± 19.3 Aa	108.6 ± 9.7 Ba
Numero de frutos	9 ± 2 Aa	7.3 ± 1.6 Ab	2.3 ± 1.0 Bb	8.1 ± 1.4 Ba	12.6 ± 1.2 Aa	5.5 ± 1.0 Ca

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 6). Letras maiúsculas iguais indicam que não há distinção entre as fontes de N, enquanto letras minúsculas iguais indicam que não há distinção entre os genótipos estudados ($p > 0,05$), calculadas pelo teste de Tukey. Fonte: Do autor (2023).

Os valores de fluorescência da clorofila *a* e as trocas gasosas estão relacionados aos parâmetros de crescimento mostrados anteriormente. Observa-se que F_v/F_m , *A* e *gs* indicam uma melhor assimilação quando as plantas são tratadas com NO_3^- , mesmo quando há um tratamento contendo ambas as fontes de N (**Figuras 3A, 3C e 3D**). Esses valores também evidenciam que o mutante *Nr* apresenta uma maior assimilação em comparação ao WT. Por outro lado, através da ETR verifica-se que as plantas *Nr* têm melhor resposta fotoquímica quando são tratadas apenas com NH_4^+ (**Figura 3B**).

Figura 3. Eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) (A), taxa de transporte de elétrons - ETR (B), assimilação de CO₂ - A (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) (C), e condutância estomática - gs (mol H₂O m⁻² s⁻¹) (D) em plantas dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO₃⁻; 100% de NH₄⁺). O genótipo selvagem (WT) é representado por barras cinzas à esquerda, enquanto o genótipo mutante *Never ripe* é representado por barras brancas à direita. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 6). Letras maiúsculas iguais indicam que não há distinção entre as fontes de N, enquanto letras minúsculas iguais indicam que não há distinção entre os genótipos estudados (*p* > 0,05), calculadas pelo teste de Tukey.

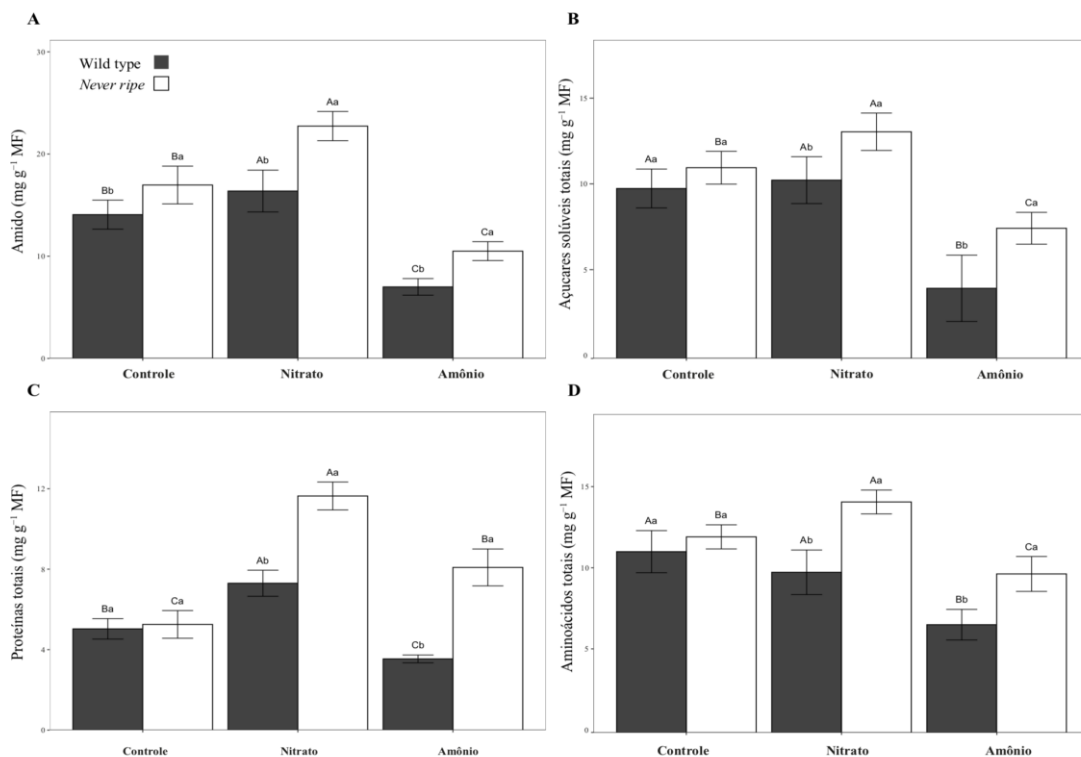


Fonte: Do autor (2023).

Em relação ao metabolismo foliar das plantas, observa-se um aumento nos teores de amido e açúcares solúveis totais quando as plantas são expostas a diferentes fontes de N (Figuras 4 A e 4B). Isso destaca a eficiência de cada um dos genótipos estudados na assimilação de diferentes fontes de N e na conversão desses nutrientes em compostos indispensáveis para o

crescimento e desenvolvimento das plantas, como as proteínas e os aminoácidos (**Figuras 4 C e 4D**).

Figura 4. Concentrações de amido (**A**), açúcares solúveis totais (**B**), proteínas totais (**C**) e aminoácidos totais (**D**) em mg g^{-1} de matéria fresca (MF) em plantas dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+). O genótipo selvagem (WT) é representado por barras cinzas à esquerda, enquanto o genótipo mutante *Never ripe* é representado por barras brancas à direita. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$). Letras maiúsculas iguais indicam que não há distinção entre as fontes de N, enquanto letras minúsculas iguais indicam que não há distinção entre os genótipos estudados ($p > 0,05$), calculadas pelo teste de Tukey.



Fonte: Do autor (2023).

De maneira complementar aos dados de fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e perfil bioquímico, existem variáveis de grande relevância que são apresentados na **Tabela 3**. Essas variáveis incluem qP, NPQ, EUA, açúcares redutores, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides totais. Esses parâmetros refletem que as plantas submetidas a diferentes fontes de N ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) respondem de maneira diferenciada entre as fontes e os genótipos

estudados. Foi demonstrado que *Nr* são fotoquimicamente mais eficientes em relação ao WT. Em relação aos parâmetros de trocas gasosas, podemos observar que as plantas seguem um padrão similar assimilando melhor uma fonte específica, como o NO_3^- . Por outro lado, nas plantas tratadas apenas com NH_4^+ , foram observadas limitações em relação a esses parâmetros em ambos os genótipos.

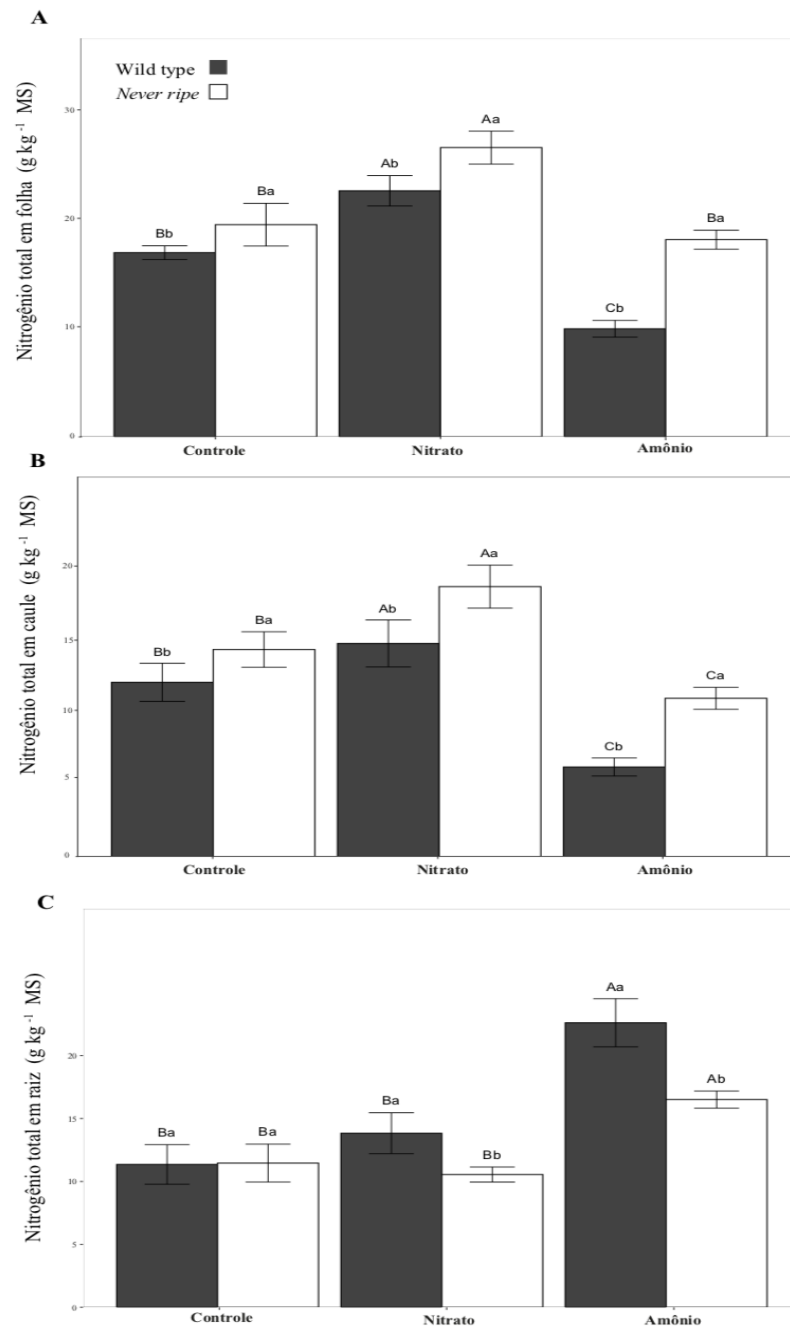
Tabela 3. Quenching fotoquímico (qP), quenching não-fotoquímico (NPQ), transpiração - *E* ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 - C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$), eficiência no uso da água - EUA ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), sacarose (mg g^{-1} de massa fresca - MF), açúcares redutores (mg g^{-1} MF), clorofila *a* (mg g^{-1} MF), clorofila *b* (mg g^{-1} MF), clorofila total (mg g^{-1} MF), razão clorofila *a/b*, carotenoides totais (mg g^{-1} MF) e razão clorofila: carotenoides em plantas dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+).

Parâmetros	Wild type			<i>Never ripe</i>		
	Controle	NO_3^-	NH_4^+	Controle	NO_3^-	NH_4^+
qP	0.68 ± 0.09 Aa	0.58 ± 0.06 Ab	0.37 ± 0.07 Bb	0.69 ± 0.09 Aa	0.78 ± 0.09 Aa	0.49 ± 0.02 Ba
NPQ	0.29 ± 0.10 Aa	0.33 ± 0.17 Aa	0.44 ± 0.25 Aa	0.23 ± 0.10 Aa	0.20 ± 0.09 Aa	0.36 ± 0.21 Aa
<i>E</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	4.8 ± 0.2 Ab	3.4 ± 0.16 Ba	2.77 ± 0.3 Ca	6.3 ± 0.04 Aa	3.5 ± 0.2 Ba	3.0 ± 0.03 Ca
C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1}$)	327.7 ± 7.3 Ab	332.6 ± 6.3 Aa	326.8 ± 15.0 Aa	359.4 ± 3.8 Aa	305 ± 12 Bb	287.0 ± 5.4 Ca
EUA ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)	2 ± 0.2 Bb	2.5 ± 0.2 Ab	1.2 ± 0.2 Cb	2.7 ± 0.2 Aa	3.1 ± 0.2 Aa	2.0 ± 0.5 Ba
Sacarose (mg g^{-1} MF)	10.2 ± 0.9 Ab	9.7 ± 1.4 Ab	4.1 ± 0.7 Bb	11.9 ± 1.6 Ba	15.2 ± 1.8 Aa	9.0 ± 0.6 Aa
Açúcares Redutores (mg g^{-1} MF)	7.2 ± 0.9 Aa	5.5 ± 1.2 Bb	3.6 ± 0.4 Cb	7.7 ± 0.7 Aa	8.9 ± 0.5 Aa	5.3 ± 1.3 Ba
Clorofila <i>a</i> (mg g^{-1} MF)	6.04 ± 0.8 Ab	6.23 ± 0.92 Ab	2.08 ± 0.6 Bb	9.18 ± 1.04 Ba	13.3 ± 1.12 Aa	5.16 ± 1.26 Ca
Clorofila <i>b</i> (mg g^{-1} MF)	3.73 ± 0.39 Bb	5.84 ± 0.90 Ab	2.08 ± 0.52 Cb	4.99 ± 0.79 Ba	7.59 ± 0.74 Aa	3.66 ± 0.80 Ca
Clorofila total (mg g^{-1} MF)	9.78 ± 0.87 Bb	12.0 ± 1.70 Ab	4.17 ± 1.09 Cb	14.1 ± 1.45 Ba	20.9 ± 1.41 Aa	8.83 ± 1.08 Ca
Razão clorofila <i>a/b</i>	1.63 ± 0.35 Aa	1.07 ± 0.11 Bb	0.99 ± 0.14 Bb	1.86 ± 0.33 Aa	1.77 ± 0.22 Aa	1.50 ± 0.66 Aa
Carotenoides totais (mg g^{-1} MF)	0.26 ± 0.05 Ab	0.33 ± 0.09 Ab	0.11 ± 0.01 Bb	0.38 ± 0.07 Ba	0.80 ± 0.14 Aa	0.26 ± 0.06 Ba
Razão clorofila: carotenoides	38.3 ± 8.8 Aa	38.2 ± 11.1 Aa	37.5 ± 10.0 Aa	37.8 ± 7.2 Aa	26.7 ± 4.7 Ab	34.7 ± 8.5 Aa

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão ($n = 6$). Letras maiúsculas iguais indicam que não há distinção entre as fontes de N, enquanto letras minúsculas iguais indicam que não há distinção entre os genótipos estudados ($p > 0,05$), calculadas pelo teste de Tukey. Fonte: Do autor (2023).

Os níveis de N total em cada um dos três segmentos das plantas avaliadas (folha, caule, raiz) mostraram que há um acúmulo diferenciado em relação a cada fonte. As plantas submetidas apenas ao NO_3^- apresentaram maior acúmulo nos órgãos aéreos em comparação com a fonte que continha apenas NH_4^+ (**Figuras 5A e 5B**). Os genótipos se comportaram de maneira semelhante quando receberam 100% de NO_3^- , ao contrário do que foi observado no tratamento com 100% de NH_4^+ , onde claramente o mutante *Nr* foi mais eficiente. O acúmulo de N total nas raízes refletiu o oposto do que ocorreu nos órgãos aéreos, onde o genótipo WT e a fonte de 100% de NH_4^+ apresentaram um maior acúmulo em relação aos demais tratamentos (**Figura 5C**).

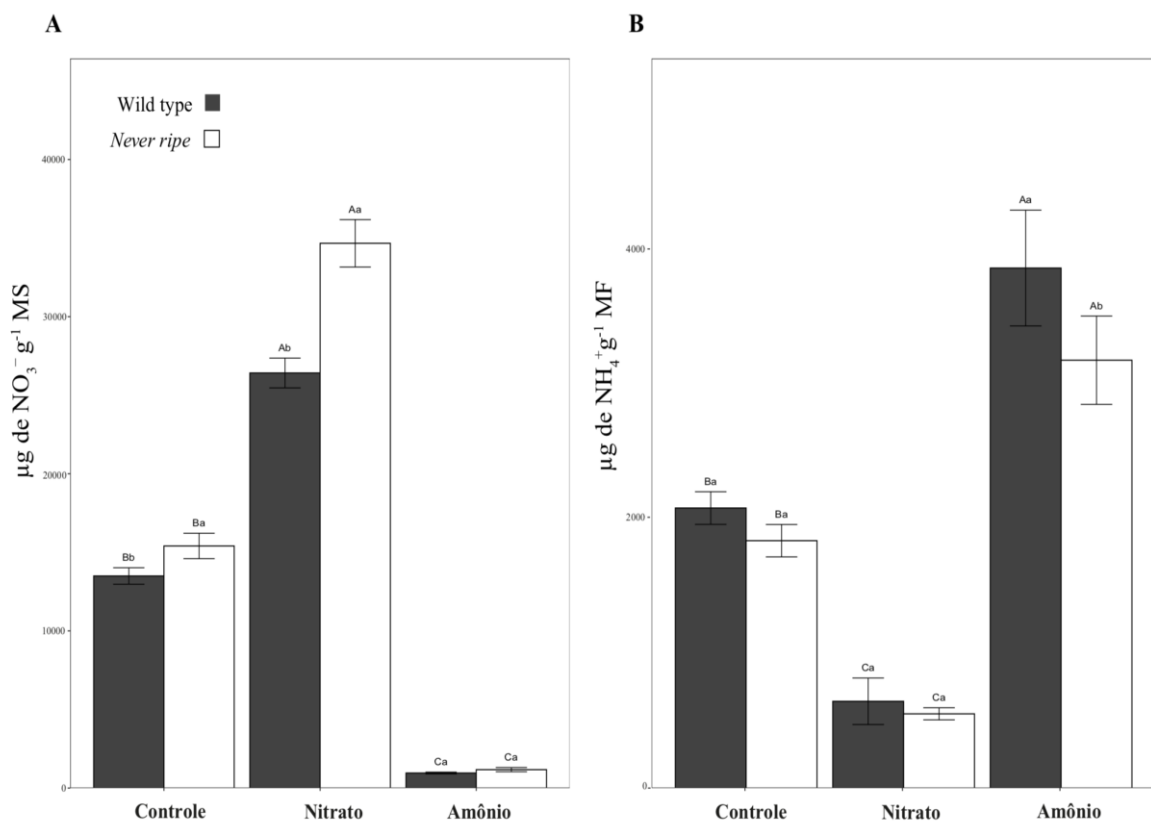
Figura 5. Concentrações de N total em folhas (g kg^{-1}) (A), nos caules (g kg^{-1}) (B) e nas raízes (g kg^{-1}) (C) em plantas dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+). O genótipo selvagem (WT) é representado por barras cinzas à esquerda, enquanto o genótipo mutante *Never ripe* é representado por barras brancas à direita. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$). Letras maiúsculas iguais indicam que não há distinção entre as fontes de N, enquanto letras minúsculas iguais indicam que não há distinção entre os genótipos estudados ($p > 0,05$), calculadas pelo teste de Tukey.



Fonte: Do autor (2023).

Os valores obtidos para a quantificação de N nas formas de NO_3^- e NH_4^+ mostraram uma maior afinidade por uma fonte específica e genótipo, onde *Nr* apresentou aumento na concentração de NO_3^- em relação ao WT (**Figura 6A**). Pode-se observar que as concentrações de NH_4^+ também seguem essa mesma tendência (**Figura 6B**). Esses dados demonstram que a planta acumula e redistribui de forma diferente, quando é fornecida com uma fonte específica de N, sendo também relevante o fator genotípico.

Figura 6. Concentrações de NO_3^- ($\mu\text{g NO}_3^- \text{g}^{-1}$ de massa seca - MS) (A) e de NH_4^+ ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1}$ de massa fresca - MF) (B) em tecidos foliares de plantas dos genótipos WT e *Never ripe* nos tratamentos (Controle; 100% de NO_3^- ; 100% de NH_4^+). O genótipo selvagem (WT) é representado por barras cinzas à esquerda, enquanto o genótipo mutante *Never ripe* é representado por barras brancas à direita. Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 6$). Letras maiúsculas iguais indicam que não há distinção entre as fontes de N, enquanto letras minúsculas iguais indicam que não há distinção entre os genótipos estudados ($p > 0,05$), calculadas pelo teste de Tukey.



Fonte: Do autor (2023)

6. DISCUSSÃO

O N é um dos elementos mais exigidos pelas plantas, sendo um importante impulsionador da produtividade através do seu papel central no metabolismo vegetal (Qian *et al.*, 2021). Existem poucos estudos até o momento que abordam os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na interação de diferentes fontes inorgânicas de N (NO_3^- e NH_4^+) e o metabolismo de sinalização do etileno. Além disso, pouco se sabe sobre as respostas fisiológicas que as plantas desenvolvem quando submetidas a estresses nutricionais relacionados a uma interação hormonal tão importante quanto a do etileno. Estudar essas relações é o primeiro passo para preencher lacunas de conhecimento que existem atualmente. Algumas espécies tendem a mostrar uma preferência por uma forma de N em relação à outras, o que frequentemente se manifesta como uma maior produção de biomassa e acúmulo de nutrientes (Britto e Kronzucker, 2013). Nossos resultados podem confirmar essa hipótese, uma vez que os parâmetros de crescimento e produtividade (**Figuras 2A e 2B**) são influenciados por uma fonte específica (NO_3^-).

Estudos anteriores relataram que plantas com baixos teores de carboidratos, como milho (*Zea mays* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.), preferem NO_3^- (Matsumoto *et al.*, Tamura, 1981), enquanto algumas plantas calcícolas, como os pinheiros *Picea glauca* (Moench) Voss e *Pinus sylvestris* L., preferem NH_4^+ (Wallander *et al.*, 1997). De fato, nossos resultados mostraram um aumento significativo na biomassa vegetal (**Figura 2C; Tabela 2**) quando as plantas foram fertilizadas apenas com NO_3^- . As concentrações de NH_4^+ , além de reduzir o crescimento e a produtividade, causaram danos em alguns órgãos fotossintéticos importantes para a produção e distribuição de carboidratos, como as folhas. Sob NH_4^+ foi observada uma evidente clorose em plantas WT, enquanto o *Nr* manteve um estado normal em seus órgãos fotossintéticos (**Figura 1B**). Um estudo recente revelou que a translocação de potássio (K^+) da raiz para as folhas é regulada pelo etileno por meio do transportador NRT1.5, o qual é responsável por esse sintoma (Fang *et al.*, 2021). Isso pode estar relacionado à falta de percepção de etileno por *Nr*, o que bloqueia os processos oxidativos e de senescência foliar em situações de estresse.

Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que levam à preferência por uma forma específica de N por parte das plantas ainda não foram totalmente decifrados. No entanto, as influências das condições ambientais (disponibilidade de N do solo, pH, temperatura, umidade, etc.) na preferência de absorção de N foram relatadas para várias espécies de plantas (Harrison *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015). Estudos como este, que buscam entender por

que ocorre a preferência por uma determinada fonte de N, permitem avançar na compreensão de novos cenários promissores, nos quais a disponibilidade de N é comprometida não apenas por fatores ambientais, mas também por respostas internas das plantas. Conhecer as implicações hormonais relacionadas a fatores nutricionais é um princípio básico para entender futuras respostas.

O NH_4^+ é uma forma paradoxal, pois, embora seja uma importante fonte de N cujo estado de oxidação elimina a necessidade de redução na célula vegetal (Salsac *et al.*, 1987), bem como, seja um intermediário em muitas reações metabólicas (Joy, 1988), pode causar sintomas de toxicidade em muitas plantas, se não em todas, quando cultivadas com NH_4^+ como única fonte de N (Vines e Wedding, 1960; Givan, 1979; van der Eerden, 1982; Fangmeier *et al.*, 1994; Gerendas *et al.*, 1997). A toxicidade do NH_4^+ pode ser universal, mas o limiar em que os sintomas de toxicidade se manifestam difere amplamente entre as espécies. Embora as condições experimentais variáveis utilizadas em diferentes estudos dificultem uma classificação rígida das plantas em grupos de tolerância, é possível encontrar algumas generalidades. Esta pesquisa permitiu evidenciar que, em plantas de tomate, concentrações de 100% de NH_4^+ provocam sintomas de toxicidade e, ao mesmo tempo, diminuição no crescimento e estrutura da planta (**Figura 1A**). Podemos também observar que o crescimento e desenvolvimento induzidos pelo NH_4^+ estão indubitavelmente ligados a alterações no equilíbrio hormonal. É importante ressaltar que nossa pesquisa relaciona como a falta de percepção do etileno pode promover melhor tolerância a toxicidade por NH_4^+ . Os resultados de nosso estudo não mostram indícios de toxicidade por NH_4^+ no *Nr* (**Figura 1B**), houve uma redução no crescimento que não afetou a produtividade (**Figura 2B**) em comparação com o WT.

A supressão do crescimento e produtividade em espécies sensíveis ao NH_4^+ pode ser grave e, por essa razão, tentar promover a redução da toxicidade por NH_4^+ é de grande importância em ambientes agrícolas e naturais. A presença de NO_3^- pode ajudar a aliviar a toxicidade por NH_4^+ por meio de sua capacidade de redução, moderando o fluxo diferencial de C entre raízes e brotos, e melhorando o fluxo de elétrons entre os fotossistemas I e II (Carrasco-Gil *et al.*, 2012). Essa influência do NO_3^- foi notável em certos parâmetros estudados, como Fv/Fm, ETR e A (**Figuras 3A, 3B e 3C**). Nas concentrações de 100% de NO_3^- e fornecimento combinado de NH_4^+ e NO_3^- , foi promovida uma eficiência fotoquímica estável. Além disso, foi demonstrado que no mutante *Nr* em relação a essas fontes de N, não ocorre distúrbio fotossintético, ao contrário do que ocorreu com WT, que foi severamente afetado quando assimilava concentrações de 100% de NH_4^+ . A melhor assimilação de N na presença de NO_3^- é

apoiada por vários estudos (Goyal et al., 1982; Ota e Yamamoto, 1989) e pode ser mecanicamente explicada pela indução do NO_3^- na via GS-GOGAT, especificamente localizada nos proplastídios das raízes (Redinbaugh e Campbell, 1993).

Os resultados anteriores mostram que as plantas do genótipo WT afetadas por concentrações de 100% de NH_4^+ sofreram fotoinibição de PSII. Isso ocorre porque, após sofrer danos em seus órgãos de assimilação de luz, elas não conseguiram regenerar seus tecidos e restaurar seu estado fotoquímico. De acordo com Tikkanen *et al.*, (2014), a fotoinibição de PSII ocorre apenas se a taxa de danos exceder a taxa de reparação. Os valores de qP, *E* e EUA seguem o mesmo padrão de preferência pelo NO_3^- como única fonte de N (**Tabela 3**). Ao mesmo tempo, observa-se uma inclinação por parte do *Nr* em ser mais eficiente fotossinteticamente em comparação com WT. O estado dos fotossistemas está diretamente relacionado com o equilíbrio gasoso, ambos influenciam na disponibilidade de fotoassimilados.

A quantificação de amido (**Figura 4A**) mostra que existem níveis mais altos quando as plantas absorvem NO_3^- como única fonte de N. Isso pode estar relacionado ao fato de que os níveis de açúcares produzidos durante a fotossíntese (**Figura 4B; Tabela 3**) foram amplamente redistribuídos para outros órgãos, enquanto o restante foi armazenado na forma de amido. Além disso, o aumento no conteúdo de amido indica que o NO_3^- interfere diretamente na atividade fotossintética, de modo que, em condições favoráveis, ocorre um excesso desse fotoassimilado, permitindo seu armazenamento. A interação entre o etileno e o N também pode aumentar a síntese de aminoácidos e proteínas (Kaack e Pedersen, 2014). Nosso estudo mostrou um aumento nos teores de proteínas e aminoácidos (**Figuras 4C e 4D**) em plantas crescidas apenas em NO_3^- , indicando uma maior eficiência por parte do mutante *Nr* em metabolizar mais NO_3^- em relação ao WT. A fonte de NH_4^+ , apesar de ter facilidade de metabolização sem gerar gasto energético, mostrou-se significativamente inferior às outras fontes avaliadas.

Os teores de clorofila *a* e *b*, principais pigmentos das folhas, foram afetados quando as plantas receberam concentrações de 100% de NH_4^+ (**Tabela 3**). Os resultados mais significativos foram observados nos tratamentos de 100% de NO_3^- e dose combinada de ambas as fontes de N. As plantas *Nr* mostraram um aumento notável nos teores de carotenoides, que podem estar atuando como agentes fotoprotetores. Esses resultados são justificados pelo estudo realizado por Coulombier *et al.* (2020), onde mencionam que as fontes de N têm influência na biossíntese de carotenoides, o que corresponderia a uma maior capacidade antioxidante.

O acúmulo de NH_4^+ é o marcador metabólico mais comum de estresse por N (Liu *et al.* 2020). De acordo com o conteúdo de biomassa (**Figura 2C**) e clorofila total (**Tabela 3**), reflète-

se que as plantas *Nr* têm uma tendência a não apresentar estresse quando as demandas de nitrogênio são supridas por meio de uma única fonte de N (NO_3^-). As concentrações de N em alguns segmentos das plantas (**Figura 5**) suportam no entendimento do fluxo de distribuição e partição de cada fonte de N avaliada. Observou-se uma maior acumulação nos órgãos aéreos nos tratamentos controle e 100% de NO_3^- (**Figuras 5A e 5B**). O NH_4^+ se acumula, na maioria das espécies, preferencialmente nas células da raiz para evitar danos ao aparato fotossintético (Esteban *et al.* 2016). As concentrações de 100% de NH_4^+ refletiram uma acumulação superior em comparação com as outras fontes estudadas (**Figura 5C**).

As maiores concentrações de NO_3^- foram encontradas nas folhas, sugerindo que este órgão é preferencial para o armazenamento de NO_3^- (**Figura 5A**). Alves *et al.*, (2016) concluíram que, no arroz, as folhas atuam como locais preferenciais de armazenamento de N. De acordo com Crawford e Glass *et al.* (1998), o excesso de absorção de NO_3^- pela planta pode ser armazenado no vacúolo, servindo como fonte de N mineral quando as concentrações são baixas no solo. As concentrações endógenas estão relacionadas com os resultados apresentados anteriormente. Existe uma assimilação diferenciada entre as fontes de N (**Figura 6**), onde o NO_3^- predominou em ambos os genótipos em comparação ao NH_4^+ . Além disso, as respostas das plantas *Nr* foram significativas, mostrando uma melhor tolerância ao NH_4^+ como única fonte de N (**Figura 6B**). Apesar das implicações adversas, essas plantas conseguiram se adaptar a condições estressantes, exibindo parâmetros de crescimento e produtividade maiores do que o genótipo WT.

7. CONCLUSÕES

Com nosso estudo foi possível compreender, em nível de metabolismo e crescimento/produção de plantas, as relações existentes entre as diferentes fontes inorgânicas de N e o metabolismo do etileno. Os dois genótipos avaliados não diferiram quanto ao melhor desenvolvimento no cultivo em meio com NO_3^- , e mostraram preferência por esta fonte em relação ao NH_4^+ . O papel desempenhado pela redução da percepção do etileno foi evidenciado em muitos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas. Ficou demonstrado ainda que existem muitas lacunas de conhecimento a serem exploradas em relação às interações hormonais e aos processos de nutrição mineral das plantas. São necessários mais estudos que relacionem as estratégias de absorção de N e as características endógenas das plantas; desse modo os processos fisiológicos e nutricionais podem ser explicados e compreendidos de maneira mais precisa, servindo assim de base para o desenvolvimento de tecnologias na área de fertilidade e produção de plantas.

8. REFERÊNCIAS

- Aida, M., (2023). Beyond the genetics of flowering: Integration of ethylene signaling and histone methylation controls flowering time, **Plant Physiology**, Volume 192, Pages 2224–2226 <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad230>
- Alves, LS., Torres, CV., Fernandes, MS., dos Santos, AM.(2016). Soluble fractions and kinetics parameters of nitrate and ammonium uptake in sunflower ('Neon' Hybrid). **Rev. Cienc. Agron.** 47, 13–21 DOI: 10.5935/1806-6690.20160002
- Azevedo, RA., Gratão, PL., Monteiro, CC. and. Carvalho, RF. (2012). What is new in the research on cadmium-induced stress in **Plants Food Energy Secur**, 1: 133-140. <https://doi.org/10.1002/fes3.10>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Britto, T. Herbert, JK. (2013). Ecological significance and complexity of N-source preference in plants, **Annals of Botany**, Volume 112, Issue 6, Pages 957–963 <https://doi.org/10.1093/aob/mct157>
- Carrasco-Gil, S., Yuberob, M., Mil-lán, R. (2012). Influence of nitrate fertilization on Hg uptake and oxidative stress parameters in alfalfa plants cultivated in a Hg-polluted soil, **Environ. Exp. Bot**, 75, 16–24, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.013>,
- Cataldo, DA., Maroon, M., Schrader, LE., & Youngs, VL. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid, **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 6:1, 71-80, doi: 10.1080/00103627509366547.
- Coulombier, N., Nicolau, E., Le Déan, L., Barthelemy, V., Schreiber, N., Brun, P., Lebouvier, N. (2020). Effects of Nitrogen Availability on the Antioxidant Activity and Carotenoid Content of the Microalgae **Nephroselmis sp.** **Marine drugs**, 18(9), 453. <https://doi.org/10.3390/md18090453>
- Crawford, NM., Glass, A. (1998). Molecular and Physiological Aspects of Nitrate Uptake in Plants. **Trends in Plant Science**, 3, 389-395. [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01311-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01311-9).
- Dische, Z. (1962). General color reactions. **Methods Carbohydrate Chemistry**, 1, 477-479. **International journal of molecular sciences**, 12160. <https://doi.org/10.3390/ijms222212160>
- Esteban, R., Ariz, I., Cruz, C., & Moran, J. F. (2016). Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. **Plant science an international journal of experimental plant biology**, 248, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.04.008>.
- Fang, XZ., Fang, SQ., Ye, ZQ., Liu, D., Zhao, KL. (2021). NRT1.1 Dual-Affinity Nitrate Transport/Signalling and its Roles in Plant Abiotic Stress Resistance. **Frontiers in plant science**,12, 715694. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.715694>

Feema, (1983). Nitrogênio Kjeldahl total (micro Kjeldahl). **Manual do Meio Ambiente Volume II** –Métodos FEEMA, R.J; MF 421. R2, p. 45, 1983

Fentem, P. A., Lea, P. J., & Stewart, G. R. (1983). Action of Inhibitors of Ammonia Assimilation on Amino Acid Metabolism in *Hordeum vulgare* L. (cv Golden Promise). **Plant physiology**, 71(3), 502–506. <https://doi.org/10.1104/pp.71.3.502>

Gaudinier, A., Rodriguez-Medina, J., Zhang, L., Olson, A., Liseron-Monfils, C., Bågman, A. M., Foret, J., Abbitt, S., Tang, M., Li, B., Runcie, D. E., Kliebenstein, D. J., Shen, B., Frank, M. J., Ware, D., & Brady, S. M. (2018). Transcriptional regulation of nitrogen-associated metabolism and growth. **Nature**, 563(7730), 259–264. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0656-3>

Gernier, H., De Pessemier, J., Xu, J., Cristescu, S. M., Van Der Straeten, D., Verbruggen, N., & Hermans, C. (2016). A Comparative Study of Ethylene Emanation upon Nitrogen Deficiency in Natural Accessions of *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in plant science**, 7, 70. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00070>.

Givan, CV. (1979). Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants, **Phytochemistry** [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81870-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81870-1)

Groat, RG., & Vance, CP. (1981). Root Nodule Enzymes of Ammonia Assimilation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Developmental patterns and response to applied nitrogen. **Plant physiology**, 67(6), 1198–1203. <https://doi.org/10.1104/pp.67.6.1198>

Hachiya, T., & Sakakibara, H. (2017). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. **Journal of experimental botany**, 68(10), 2501–2512. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw449>

Harrison, KA., Bol, R. (2007). Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. **Ecology**, 88: 989-999. <https://doi.org/10.1890/06-1018>

Hawkesford, MJ., Cakmak, I., Coskun, D., De Kok, LJ., Lambers, H., Schjoerring, JK., White, PJ. (2023). **Functions of macronutrients. LTD.** 201-281 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819773-8.00019-8>.

Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., & Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of experimental botany**, 58(9), 2369–2387. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm097>

Hobbie, EA., & Högberg, P. (2012). Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics. **New Phytologist**, 196(2), 367–382. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04300.x

Houben, M., & Van de Poel, B. (2019). 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase (ACO): The Enzyme That Makes the Plant Hormone Ethylene. **Frontiers in plant science**, 10, 695. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695>

- Huang, X., Mi, W., Hong, N., Ito, H., & Kawagoshi, Y. (2020). Efficient transition from partial nitrification to partial nitrification/Anammox in a membrane bioreactor with activated sludge as the sole seed source. **Chemosphere**, 253, 126719. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126719>
- Hunt, R., Causton, DR., Shipley, B., & Askew, AP. (2002). A modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of botany**, 485–488. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf214>
- Iqbal, N., Nazar, R., Syeed, S., Masood, A., & Khan, N. A. (2011). Exogenously-sourced ethylene increases stomatal conductance, photosynthesis, and growth under optimal and deficient nitrogen fertilization in mustard. **Journal of experimental botany**, 62(14), 4955–4963. <https://doi.org/10.1093/jxb/err204>
- Jahan, B., Rasheed, F., Sehar, Z., Fatma, M., Iqbal, N., Masood, A., Anjum, N. A., et al. (2021). Coordinated Role of Nitric Oxide, Ethylene, Nitrogen, and Sulfur in Plant Salt Stress Tolerance. Stresses, Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/stresses1030014>
- Jensen, M., Lam, P., Revsbech, N. et al. (2011). Intensive nitrogen loss over the Omani Shelf due to anammox coupled with dissimilatory nitrite reduction to ammonium. 1660–1670 <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.44>
- Joy, KW. (1988). Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon–nitrogen interface. **Canadian Journal of Botany** 66, 2103–2109. doi: 10.1139/b88-288
- Kaack, K., & Hanne LP. (2014) Effects of Potassium, Phosphorus and Nitrogen Fertilization on Endogenous Ethylene and Quality Characteristics of Apples (*Malus Domestica* L.) **Plant Nutrition**, 37:7, 1148-1155, DOI:10.1080/01904167.2013.868484
- Khan, M. I., Trivellini, A., Fatma, M., Masood, A., Francini, A., Iqbal, N., Ferrante, A., & Khan, N. A. (2015). Role of ethylene in responses of plants to nitrogen availability. **Frontiers in plant science**, 6, 927. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00927>
- Koornneef, M., Bosma, TD., Hanhart, CJ., van der Veen, JH., & Zeevaart, J.A. (1990). The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. TAG. Theoretical and applied genetics. **Theoretische und angewandte Genetik**, 80(6), 852–857. <https://doi.org/10.1007/BF00224204>
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O., & Edwards, GE. (2004). New Fluorescence Parameters for the Determination of QA Redox State and Excitation Energy Fluxes. **Photosynthesis research**, 209. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d>
- Lee, ZH., Hirakawa, T., Yamaguchi, T. (2019). The Roles of Plant Hormones and Their Interactions with Regulatory Genes in Determining Meristem Activity. **International journal of molecular sciences** <https://doi.org/10.3390/ijms20164065>
- Li J., Du Q., Peng H., Zhang Y., Bi Y., Shi Y., et al., (2020). Optimization of biochemical oxygen demand to total nitrogen ratio for treating landfill leachate in a single-stage partial nitrification-denitrification system. **J. Clean. Prod.** 266:121809. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.121809

Li, S., Zhou, L., Addo-Danso, S. D., Ding, G., Sun, M., Wu, S., & Lin, S. (2020). Nitrogen supply enhances the physiological resistance of Chinese fir plantlets under polyethylene glycol (PEG)-induced drought stress. **Scientific reports**, 10(1), 7509. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64161-7>

Lichtenthaler, HK. (2001), Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 1: F4.3.1-F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>

Lima, E. (2010). Ammonium Triggers Lateral Root Branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-Dependent Manner, **The Plant Cell**, Volume 22, Pages 3621–3633, <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076216>

Liu, X. X., Zhu, Y. X., Fang, X. Z., Ye, J. Y., Du, W. X., Zhu, Q. Y., Lin, X. Y., & Jin, C. W. (2020). Ammonium aggravates salt stress in plants by entrapping them in a chloride over-accumulation state in an NRT1.1-dependent manner. *The Science of the total environment* 746, 141244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141244>.

Liu, XY., Koba, K., Makabe, A., Li, XD., Yoh, M. (2013). Ammonium first: natural mosses prefer atmospheric ammonium but vary utilization of dissolved organic nitrogen depending on habitat and nitrogen deposition. **New Phytol**, 199: 407-419. <https://doi.org/10.1111/nph.12284>

Liu, Y., Lai, N., Gao, K., Chen, F., Yuan, L., & Mi, G. (2013). Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in Arabidopsis thaliana. *PloS one*, 8(4), e61031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061031>.

Ma H., Xue Y., Zhang Y., Kobayashi T., Kubota K., Li Y.-Y. (2020). Simultaneous nitrogen removal and phosphorus recovery using an anammox expanded reactor operated at 25 °C. *Water Res.* 172:115510. doi: 10.1016/j.watres.2020.115510

Ma, B., Ma, T., Xian, W., Hu, B., & Chu, C. (2023). Interplay between ethylene and nitrogen nutrition: How ethylene orchestrates nitrogen responses in plants. **Journal of integrative plant biology**, 65(2), 399–407. <https://doi.org/10.1111/jipb.13355>

Matsumoto, h., & tamura, k. (1981). Respiratory stress in cucumber roots treated with ammonium or nitrate nitrogen. **Plant and Soil**. 195–204. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02374104>

Miller, GL. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar **Analytical Chemistry** 31 (3), 426-428 DOI: 10.1021/ac60147a030

Nascimento, V. L., Pereira, A. M., Pereira, A. S., Silva, V. F., Costa, L. C., Bastos, C. E. A., Araújo, W. L. (2020). Physiological and metabolic bases of increased growth in the tomato ethylene-insensitive mutant Never ripe: extending ethylene signaling functions. **Plant Cell Reports**, 40(8), 1377–1393. doi:10.1007/s00299-020-02623-y

Pailles, Y., et al., (2020). Diverse Traits Contribute to Salinity Tolerance of Wild Tomato Seedlings from the Galapagos Islands, **Plant Physiology**, Volume 182, Issue 1, January, Pages 534–546, <https://doi.org/10.1104/pp.19.00700>

Qian Y., Ding Y., Ma H., Chi Y., Yuan H., Li Y.-Y., et al., (2021). Startup and performance of a novel single-stage partial nitrification/anammox system for reject water treatment. **Bioresour. Technol.** 321:124432. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124432

Redinbaugh, MG., & Campbell, WH. (1993). Glutamine Synthetase and Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase Expression in the Maize (*Zea mays*) Root Primary Response to Nitrate (Evidence for an Organ-Specific Response). **Plant physiology**, 1249–1255. <https://doi.org/10.1104/pp.101.4.1249>

Salsac, L. (1987). Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.25, n.6, p.805-812,

Song, MH., Zheng, LL., Suding, K.N. et al., (2015). Plasticity in nitrogen form uptake and preference in response to long-term nitrogen fertilization. **Plant Soil** 394, 215–224 <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2532-3>

Song, S., Ge, M., Wang, W., Gu, C., Chen, K., Zhang, Q., Yu, Q., Liu, G., & Jiang, J. (2022). BpEIN3.1 represses leaf senescence by inhibiting synthesis of ethylene and abscisic acid in *Betula platyphylla*. **Plant science an international journal of experimental plant biology**, 321, 111330. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111330>.

Takahashi, J. (2020). Study on Quantitative Analysis of Carbon and Nitrogen in Stoichiometric θ -Fe₃C and γ '-Fe₄N by Atom Probe Tomography, **Microscopy and Microanalysis**, Volume 26, Issue 2, 185–193, <https://doi.org/10.1017/S1431927620000045>

Takushi, H., Hitoshi S. (2017). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants, **Journal of Experimental Botany**, Volume 68, Issue 10, 1 May, Pages 2501–2512, <https://doi.org/10.1093/jxb/erw449>

Taylor, IB., Thompson, AJ (2000). Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51 <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.350.1563>

Thompson, RL., Lassaletta, L., Patra, P.K. et al. (2019). Acceleration of global N₂O emissions seen from two decades of atmospheric inversion. **Nat. Clim. Chang.** 9, 993–998). <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0613-7>

Tikkanen, M., Mekala, N. R., & Aro, E. M. (2014). Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochimica et biophysica acta*, 1837(1), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.001>

Van, E. (1997). Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. **Environmental pollution** [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00434-7](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00434-7)

Vines, H. M., & Wedding, R. T. (1960). Some Effects of Ammonia on Plant Metabolism and a Possible Mechanism for Ammonia Toxicity. **Plant physiology**, 35(6), 820–825. <https://doi.org/10.1104/pp.35.6.820>

Wallander, H., Wickman, T., & Jacks, G. (1997). Apatite as a P source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. **Plant and Soil**, 196(1), 123–131. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1014936217105>

Walch-Liu, P., Gan, Y., Remans, T., & Forde, B. G. (2006). Nitrogen regulation of root branching. **Annals of botany**, 97(5), 875–881. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj601>

Wang, C., Zhao, Y., Xie, B., Peng, Q., Hassan, M., & Wang, X. (2014). Nitrogen removal pathway of anaerobic ammonium oxidation in on-site aged refuse bioreactor. **Bioresour technology**, 159, 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.093>

Wang H., Song Q., Wang J., Zhang H., He Q., Zhang W., et al. (2018). Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor with high dissolved oxygen: effects of carbon to nitrogen ratios. **Sci. Total Environ** 642, 1145–1152. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.081

Wang, M., Shen, Q., Xu, G., & Guo, S. (2014). New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells. **International review of cell and molecular biology**, 310, 1–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00001-3>

Wilkinson, J. Q., Lanahan, MB., Yen, HC., Giovannoni, JJ., & Klee, H. J. (1995). An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. **Science** (New York, N.Y.) <https://doi.org/10.1126/science.270.5243.1807>

Yadav, D., Al-Balushi, S., Awasthi, MK., et al. (2023). Convective flow of ethylene glycol-silver Jeffery nanofluid in a Hele-Shaw cell with an influence of external magnetic field. **Asia-Pac J Chem** 18. doi:10.1002/apj.2884

Yamamoto Y. (1990) Effects of different nitrogen sources on glutamine synthetase and ferredoxin dependent glutamate synthase activities and on free amino acid composition in radish plants, **Soil Science and Plant Nutrition**, 36:4, 645-652, doi:10.1080/00380768.1990.10416801

Yuan, Z., (2009). Global trends in senesced-leaf nitrogen and phosphorus. **Global Ecology and Biogeography**, 18: 532-542. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2009.00474.x>