

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

LAURA PRADO DA SILVA

**INTERAÇÕES ENTRE O DÉFICIT HÍDRICO E A DISPONIBILIDADE
DE NITROGÊNIO NAS TROCAS GASOSAS E NO METABOLISMO
SECUNDÁRIO DE *Amaranthus cruentus* L.**

BAURU, 2021

LAURA PRADO DA SILVA

**INTERAÇÕES ENTRE O DÉFICIT HÍDRICO E A DISPONIBILIDADE
DE NITROGÊNIO NAS TROCAS GASOSAS E NO
METABOLISMO SECUNDÁRIO DE *Amaranthus cruentus* L.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas, área de
concentração Meio Ambiente.
Orientadora: Prof^a Dra. Inês Cechin

BAURU, 2021

S586i Silva, Laura Prado da
Interações entre o déficit hídrico e a disponibilidade de nitrogênio nas trocas gasosas e no metabolismo secundário de *Amaranthus cruentus* L. / Laura Prado da Silva. -- Bauru, 2021
51 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientadora: Inês Cechin

1. Botânica. 2. Fisiologia Vegetal. 3. Morfologia Vegetal. I. Título.

LAURA PRADO DA SILVA

INTERAÇÕES ENTRE O DÉFICIT HÍDRICO E A DISPONIBILIDADE
DE NITROGÊNIO NAS TROCAS GASOSAS E NO METABOLISMO
SECUNDÁRIO DE *Amaranthus cruentus* L.

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas, área de
concentração Meio Ambiente.

Bauru, 20 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Inês Cechin – UNESP - Bauru/SP

Prof.^a Dra. Veridiana De Lara Weiser Bramante – UNESP – Bauru/SP

Prof. Dr. Aloísio Costa Sampaio – UNESP – Bauru/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Universo e conseqüentemente a Deus, por toda força e energia emanadas para que fosse através de muita luta conquistada a tão sonhada e merecida glória.

Agradeço à minha família, aos meus pais, Mônica e Paulo, e ao meu irmão Octávio, por sempre acreditarem em mim, permanecerem ao meu lado (ainda que à km de distância na maior parte do tempo) me dando todo o amor e suporte para nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço especialmente à minha orientadora e Prof.^a Dra. Inês Cechin por toda atenção, disponibilidade e assistência oferecida desde todas as aulas ministradas em meu segundo ano de graduação, incluindo as monitorias e minha iniciação científica até o presente momento do trabalho de conclusão de curso. Sou extremamente grata por cada reunião, cada sugestão e conselho oferecido, sendo todas as coisas absurdamente enriquecedoras em minha formação enquanto pessoa e profissional.

Agradeço também à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela oportunidade de exercer a função de bolsista de Iniciação Científica de Treinamento Técnico 1, e assim aprender e participar de um projeto tão interessante e impulsionador enquanto futura pesquisadora. Muitíssimo obrigada.

Agradeço à UNESP (Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’), por proporcionar acontecimentos tão significativos e inesquecíveis dentro da esfera universitária e acadêmica.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de jornada durante o período engrandecedor que foi a graduação, ao Davi (meu antigo colega de apartamento e grande amigo) por sempre me apoiar em momentos difíceis e promover uma leveza e descontração genuínas e valiosas, além de colaborar com meus processos de desenvolvimento enquanto ser humano e futura profissional, e agradeço principalmente ao Biomanas, um grupo de pessoas extraordinárias e que proporcionaram tantos momentos inesquecíveis e maravilhosos em minha vida universitária.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

RESUMO

A disponibilidade de água e nitrogênio são fatores ambientais que podem prejudicar o crescimento das plantas e, quando combinados, seus efeitos podem ser intensificados ou reduzidos. O objetivo deste estudo foi analisar a influência da disponibilidade de nitrogênio nas respostas metabólicas de *Amaranthus cruentus* L. ao estresse hídrico. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos tendo como substrato a vermiculita, e foram mantidas na casa de vegetação sendo irrigadas com a solução de Long Ashton a 70% contendo 1,97 ou 9,88 kg N ha⁻¹ de nitrato de amônio, três vezes por semana. As plantas foram estressadas por suspensão da rega após 42 dias de crescimento. Foram avaliados os parâmetros fotossintéticos das plantas e as folhas foram colhidas para análise química. O maior suprimento de nitrogênio aumentou a matéria seca da parte aérea, os pigmentos fotossintéticos, a fotossíntese, a condutância estomática, a transpiração, o nitrogênio foliar total, a prolina, o nitrato e o amônio, mas reduziu a concentração de flavonoides e fenóis totais. O estresse hídrico por seis dias não afetou a matéria seca, os pigmentos fotossintéticos, o nitrogênio foliar, o amônio e os metabólitos especializados, mas aumentou a prolina e afetou negativamente as demais variáveis. As interações observadas entre o nitrogênio e o suprimento de água resultaram em nenhum alívio dos efeitos negativos da seca sobre o amaranto. Embora o aumento da disponibilidade de nitrogênio tenha beneficiado o desempenho das plantas, intensificou o efeito negativo do estresse hídrico. Após 24 horas de reidratação, as plantas foram capazes de se recuperar do efeito negativo do estresse hídrico.

Palavras-chave: Acumulação de nitrato, componentes fenólicos, estresse hídrico, fotossíntese, massa seca, reidratação e prolina.

ABSTRACT

Water and nitrogen availability are environmental factors that can impair plant growth, and when they are combined their effects can be intensified or reduced. The objective of this study was to analyse the influence of nitrogen availability on the responses of *Amaranthus cruentus*'s metabolisms to water stress. The plants were cultivated in plastic pots filled with vermiculite and kept under greenhouse conditions and were watered with 70% of full strength nitrogen-free Long Ashton solution, containing 1.97 or 9.88 kg N ha⁻¹ as ammonium nitrate, three times a week. The plants were stressed by suspension of watering after 42 days of growth. Photosynthetic parameters were evaluated *in planta* and leaves were harvested for chemical analysis. Higher nitrogen supply increased the shoot dry matter, photosynthetic pigments, photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, total leaf nitrogen, proline, nitrate and ammonium but reduced the concentration of flavonoids and total phenols. Water stress for 6 days did not affect dry matter, photosynthetic pigments, leaf nitrogen, ammonium or specialized metabolites but increased the proline and affected negatively the other variables. The observed interactions between nitrogen and water supply resulted in no alleviation of the negative effects of drought on amaranth. Although the increase in nitrogen supply had benefits on plant performance, it intensified the negative effect of water stress. After 24 h of rehydration, the plants were able to recover from the negative effect of water stress.

Keywords: Dry matter, Nitrate accumulation, Phenolic compounds, Photosynthesis, Proline, Rehydration, Water Stress.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Amaranthus* é representado por aproximadamente 60 espécies, sendo considerado pertencente à classe das dicotiledôneas e à família das Amaranthaceae. A importância deste gênero é evidenciada em suas características de natureza histórica, alimentícia, fisiológica e agrônômica (SPEHAR, 1998; SPEHAR & LARA CABEZAS, 2001). De acordo com o contexto histórico, o amaranto é uma “granífera” originária de antigas civilizações americanas, com elevada capacidade produtiva de biomassa realizando a reciclagem dos nutrientes presentes nos mais diversos sistemas produtivos (RIVERO, 1994; SPEHAR et al., 1997). O uso histórico mais significativo do amaranto como cultura em grãos se deu no México central durante a civilização Asteca (MYERS, 1996), sendo de extrema importância em práticas religiosas realizadas não somente pela civilização Asteca, como também nas civilizações Maias e Incas.

Segundo CASELATO E AMAYA-FARFÁN (2012), no âmbito religioso as sementes do amaranto eram moídas e misturadas junto ao sangue advindo de sacrifícios humanos a fim de evidenciar uma forma de oferecimento às divindades cultuadas pelas culturas anteriormente citada. Em meados da década de 60, o amaranto foi levado para a Europa, sendo que somente 20 anos após tal feito ele difundiu-se pelas montanhas do Nepal e no leste africano, sendo assim cultivado também na China, África, Europa e América do Norte (MYERS, 1996). Conforme Sauer (1950), no que se refere às suas características nutricionais, o gênero se destaca por apresentar-se como um alimento naturalmente nutricional e funcional podendo tanto suas folhas quanto suas sementes serem consumidas. As folhas das plantas jovens de *A. cruentus* podem ser utilizadas em saladas e sopas e os grãos são utilizados na produção de pães, bolos, biscoitos e adicionados às sopas (AMAYA-FARFÁN, 2005). Além de importantes metabólitos nutricionalmente primários, as plantas de amaranto também contêm alguns compostos de metabólitos secundários que também desempenham um papel importante na dieta humana além de desempenhar algumas funções especiais nas plantas (RASTOGI; SHUKLA, 2013). O consumo de *A. cruentus* tem sido recomendado em vários países para contribuir com diversos benefícios como atividade antioxidante, aumento da pró-vitamina A e compostos anticancerígenos em uma dieta saudável devido ao seu perfil metabólico

secundário específico (NEUGART et al., 2017). Entretanto, no Brasil, o amaranto é praticamente desconhecido.

As sementes ou “grãos” de amaranto possuem elevada demanda por apresentarem um elevado valor proteico em sua composição, com aproximadamente 15 % de proteína, quando comparadas aos demais cereais. A proteína em questão se destaca devido sua alta qualidade biológica em virtude de seu conteúdo de lisina e ainda outros aminoácidos essenciais. Tais fatores situam o amaranto como um dos principais cereais no que diz respeito ao potencial nutricional em detrimento de outros cereais existentes no mundo (BRESSANI, 1988; BREENE, 1991). Dentre seus compostos bioativos, a grande parte deles como o ácido linoleico, taninos, alcaloides, flavonoides e betalaínas detêm propriedades medicinais, apresentando atividades analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antimaláricas, antitumorais, dentre outras (KUMAR et al., 2014). Tais compostos são empregados abundantemente como corantes alimentícios, fármacos e cosméticos, sendo muito requeridos devido às preocupações dos consumidores sobre alternativas aos sintéticos e pela atividade biológica que apresentam (STINTZING; CARLE, 2007). Dentre os diferentes usos do amaranto segundo Teixeira et. al (2003), caracterizam-se a utilização deste como espécie forrageira na China, enquanto que nos continentes africano e americano sua produção é na forma de hortaliça através do consumo de suas folhas, bem como na forma de “grãos” na produção de pães, biscoitos e produtos alimentícios que abrangem indivíduos diagnosticados com a doença celíaca visto que não apresenta glúten, de acordo com Amaya-Farfan et al. (2005), variados derivados do processamento de seus grãos.

Tendo em vista o *Amaranthus* como um gênero pertencente ao grupo de plantas do tipo C₄, ele apresenta características específicas deste grupo. Dentre as características, tem-se sua adaptação aos habitats quentes, sendo menos abundantes em regiões de temperaturas baixas. Em condições ideais, o metabolismo das plantas pertencentes ao tipo C₄ promove vantagens no que se refere à capacidade fotossintética, visto que os benefícios para a realização do transporte de CO₂ das células do mesófilo para as células da bainha do feixe vascular superam os custos em ATP (TAIZ, et al., 2017). De igual importância no que se refere a capacidade fotossintética enquanto gênero classificado como tipo C₄, o *Amaranthus* tem resposta significativa na produção de biomassa em condições de cultivo com elevadas

temperaturas e intensa disponibilidade luminosa, conferindo assim um crescimento rápido de área vegetal externa, ou seja, acima do solo (COSTA, D. et al., 2008).

Em relação ao cultivar BRS Alegria, produzido tendo por base a linhagem de *Amaranthus cruentus* AM 5189 advinda dos Estados Unidos da América (EUA), foi comprovado por meio de estudos que na safra deste cultivar BRS Alegria selecionado houve, em ausência de estresse hídrico e com irrigação no período entressafra, níveis de produção de biomassa e “grãos” de modo bastante considerável (SPEHAR, et al., 2003). Logo, estas características vinculadas ao curto período de emergência e maturação favorecem a sua capacidade potencial enquanto utilização no sistema de plantio direto, culminando consequentemente numa maximização do rendimento deste cultivar após sua semeadura no período adequado (SPEHAR, 1994; SPEHAR & LANDERS, 1997). A Embrapa Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados juntamente com as universidades de Brasília, Uberlândia e Tocantins e também com a Associação de Plantio Direto nos Cerrados focou justamente na adaptação das espécies de plantas a fim de diversificar o sistema produtivo através da seleção destas baseadas especialmente na rápida capacidade de estabelecimento, bem como no grau de tolerância de déficit hídrico, produção de biomassa, ciclagem de nutrientes e utilização alimentícia tanto humana quanto animal (SPEHAR, 1998; SPEHAR & LARA CABEZAS, 2001).

As plantas são entendidas como a principal via de passagem dos nutrientes disponíveis no ambiente geofísico para o ambiente biológico de uma maneira dinâmica. Dentre os inúmeros compostos nutricionais essenciais para o funcionamento básico das espécies vegetais, o Nitrogênio (N) detém um papel fundamental na manutenção e desenvolvimento fisiológico e metabólico de tais espécies. Sabe-se que este elemento químico é caracterizado como o macronutriente exigido em maior quantidade pelas culturas agrícolas, visto que atua no crescimento e desenvolvimento, devido às funções que exerce no metabolismo das plantas, como constituinte da molécula de clorofila, ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas (TAIZ, et al., 2017). Cerca de 65% do nitrogênio foliar é encontrado nos cloroplastos (BROWN, 1978; HAK et al., 1993), grande parte na forma de Rubisco. Desta forma, qualquer alteração na sua disponibilidade afetará o desempenho das plantas.

O nitrogênio é considerado um macronutriente de extrema importância para as plantas visto que faz parte das mais importantes biomoléculas tais como ATP,

NADP, NADPH, clorofila, aminoácidos, proteínas e incontáveis enzimas (HARPER, 1994). Em diversos sistemas de produção agrícola, o nitrogênio é classificado como um fator limitante por apresentar influências no crescimento das espécies vegetais mais do que qualquer outro nutriente. Fertilizantes nitrogenados inorgânicos e orgânicos são amplamente utilizados a fim de aumentar a produtividade das culturas, de forma a suprir a demanda crescente de alimentos pela população. Normalmente, menos de 50 % do nitrogênio aplicado sob a forma de fertilizante é utilizado pelas culturas. As perdas no solo se dão pelos diversos processos aos quais o nitrogênio está sujeito. O nitrogênio é perdido em grande parte pela lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de N_2 , N_2O e outros óxidos de nitrogênio (ANGHINONI, 1986). A eficiência na utilização do N pela planta leva em conta os aspectos de absorção e metabolização deste elemento. Dentre os muitos aspectos evidenciados ao serem afetados pela deficiência de nitrogênio, ou seja, uma menor disponibilidade deste elemento nos órgãos vegetais, são considerados principalmente a relação entre raiz e parte aérea, capacidade fotossintética e produção de matéria seca (FERREIRA et al., 2015). A redução da fotossíntese sob deficiência de nitrogênio está relacionada à redução da atividade da clorofila e das enzimas fotossintéticas (SEEPAL; GEORGE; WRIGHT, 2016; MAKINO; UENO, 2018).

O aumento da disponibilidade de nitrogênio leva a uma maior concentração de nitrogênio na folha de *A. cruentus*, resultando em uma forte correlação positiva entre capacidade fotossintética e nitrogênio foliar, e isso se traduziu em maior acúmulo de matéria seca (CECHIN; VALQUILHA, 2019). Porém, altas doses de fertilização com nitrogênio também podem resultar no acúmulo de nitrato nas plantas (SAREER et al., 2016; CECHIN e VALQUILHA, 2019), afetando assim qualidade nutricional e a segurança das partes comestíveis. A ingestão de alto teor de nitrato tem efeitos adversos na saúde humana como metahemoglobinemia e doenças gastrointestinais (ANJANA et al., 2007). No entanto, Cechin e Valquilha (2019) concluíram que a quantidade de nitrato acumulada nas folhas de plantas de *A. cruentus* cultivadas em alta dose de nitrogênio não representa qualquer risco para a saúde humana de acordo com os limites sugeridos pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1995).

A água é considerada essencial para manutenção das células existentes no vegetal, bem como nos sistemas presentes na planta como um todo (TAIZ et al., 2017). Sua disponibilidade tem grande relevância no que se refere ao crescimento

vegetal. A umidade atua de forma a favorecer a absorção de água e nutrientes pela planta, promovendo assim condições mais propícias de crescimento e desenvolvimento de modo satisfatório (CLAY; TROOIJEN, 2017). Logo, é válido salientar que a água exerce papel fundamental nos processos metabólicos e fisiológicos das espécies vegetais, atuando principalmente na capacidade fotossintética, mas também nos processos de absorção de nutrientes através das raízes e pelas trocas gasosas que ocorrem nas folhas. Devido a intensificação do aquecimento global, as mudanças climáticas e o risco de eventos extremos, como secas prolongadas, devem aumentar nos próximos anos, estimando-se que as áreas rurais tenham grandes impactos na disponibilidade e abastecimento de água (PACHAURI et al., 2014), resultando em perdas na agricultura. É bem sabido que o déficit hídrico é considerado um dos principais estresses abióticos que afeta a produtividade da planta devido aos seus efeitos negativos no crescimento da planta (FAHAD et al., 2017) e fotossíntese (LI et al., 2014). Sob condições de estresse hídrico, acúmulo ativo de solutos compatíveis, como a prolina, é reivindicado ser um mecanismo eficaz de tolerância ao estresse. A prolina funciona como um osmoprotetor e como um agente antioxidante sob condições de estresse (KISHOR; SREENIVASULU, 2014). O acúmulo de osmólitos nas células vegetais pode, portanto, ser importante na manutenção de vários processos fisiológicos em operação, mesmo sob condições de estresse.

Segundo Ayodele (2001), a ocorrência do estresse hídrico em diferentes fases do desenvolvimento da espécie vegetal demonstra a influência do suprimento de água durante a fase vegetativa e reprodutiva, incluindo nesta última o processo de floração e formação de sementes. A relação entre o aporte nutricional do macronutriente N e a suplementação de água corroboram que há interação entre tais fatores nos mecanismos essenciais de manutenção e regulação do metabolismo secundário das plantas.

De acordo com Castro et. al (2017), em condições naturais, as plantas raramente experienciam a atuação de somente um fator abiótico de cada vez, encontrando-se na verdade muito mais suscetíveis a exposição de múltiplos fatores estressores simultaneamente. Esses múltiplos fatores estressores costumam atuar interagindo entre si, de forma a interferir em processos metabólicos de forma conjunta. Mittler (2006), destacou a importância de estudar a tolerância das plantas a uma

combinação de diferentes condições de estresse, pois nessa situação os danos podem ser letais para as plantas. Com base em pesquisas realizadas a fim de compreender cientificamente de que modo os múltiplos fatores estressores atuam no metabolismo secundário das espécies vegetais, é possível obter informações que identifiquem seus papéis biológicos nos variados mecanismos de estresse causados, fornecendo critérios para que sejam descritas suas atividades num possível aumento de rendimentos e qualidade de produtos formados (NCUBE et. al., 2012). Embora existam dados sobre o efeito da seca e da disponibilidade de nitrogênio no desempenho da planta quando aplicados isoladamente, há menos informações disponíveis sobre seus efeitos interativos.

Portanto, conforme há menor disponibilidade de suprimento hídrico em combinação com níveis variados de nitrogênio disponíveis, há uma tentativa de modificação do metabolismo da planta, convertida em respostas fisiológicas a fim de evitar danos em seus processos mais importantes, como a síntese de determinados compostos atuantes com efeito protetivo (por exemplo, a prolina), o mecanismo fotossintético, a taxa de transpiração, a produção de matéria seca acima do solo, o desenvolvimento da área foliar, e o desenvolvimento da raiz e do caule.

2. OBJETIVO

Com base em estudos anteriores em outras espécies, levantamos a hipótese de que o suprimento de nitrogênio poderia alterar a sensibilidade do *A. cruentus* cultivar BRS Alegria ao estresse hídrico, isto é, que os danos causados pelo estresse hídrico no *A. cruentus* depende do seu status de nitrogênio. Assim, o objetivo do presente projeto consistiu no alcance de uma melhor compreensão das respostas do amaranto tanto ao aumento da disponibilidade de nitrogênio quanto à escassez de água e suas interações nas seguintes variáveis: massa seca da parte aérea, trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, conteúdo relativo de água, teores foliares de prolina, nitrogênio total, nitrato, amônio e compostos fenólicos. Também foi avaliada a capacidade de recuperação destas variáveis nas plantas após 24 h de reidratação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Material Biológico

Foram utilizadas sementes de *Amaranthus cruentus* L. cultivar BRS Alegria, fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

3.2) Condições de Cultivo

Sementes de amaranto foram plantadas em vasos plásticos com capacidade para quatro litros contendo vermiculita como substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições fotoperiódicas naturais durante o período experimental. O conteúdo de nitrogênio nas plantas foi manipulado através do suprimento de 250 mL vaso⁻¹ de solução nutritiva de Long Ashton (HEWITT, 1966) a 70% com diferentes concentrações de nitrogênio na forma de nitrato de amônio, três vezes por semana durante o período de crescimento. As plantas foram divididas inicialmente em dois grupos de acordo com o suprimento de nitrogênio. Tal macronutriente foi aplicado nas doses: 9.88 e 1.97 Kg N ha⁻¹ as quais correspondem a 100 e 20% da solução nutritiva, respectivamente. As plantas foram irrigadas com água de torneira sempre que houvesse necessidade. Quarenta e dois dias após o plantio, os dois grupos de plantas foram divididos novamente em plantas bem irrigadas e plantas estressadas. O estresse hídrico foi induzido através da suspensão da rega (estresse progressivo) e este conduzido até que as plantas apresentassem inibição da taxa fotossintética. Nas plantas controle (não estressadas) o suprimento de solução nutritiva foi suspenso e repostado pelo suprimento de água somente. As plantas de amaranto foram então divididas em quatro grupos:

- I. Plantas bem hidratadas e baixa dose de nitrogênio
- II. Plantas bem hidratadas e alta dose de nitrogênio
- III. Plantas estressadas e baixa dose de nitrogênio
- IV. Plantas estressadas e alta dose de nitrogênio

Ao final do período de estresse, parte das plantas estressadas foram reidratadas para avaliação da capacidade de recuperação destas após 24h de reidratação.

3.3) Medidas de trocas gasosas e Conteúdo Relativo de Água (CRA)

As medidas de trocas (fotossíntese, condutância estomática, transpiração e concentração de CO₂ na cavidade subestomática) foram realizadas na folha mais jovem totalmente expandida no final do período de estresse e após 24h de reidratação através do uso de um analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA-LCpro, ADC, Hoddesdon, UK). Os horários de tais medidas realizadas ocorreram entre 8 e 10 h da manhã dentro da casa de vegetação sob condições de pressão parcial de CO₂ e de temperatura ambientes. Radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de aproximadamente 1000 µmol m⁻² s⁻¹ foi suprida por uma lâmpada acoplada à câmara foliar. A folha foi mantida sob este PAR até que uma taxa de estado estacionário fosse alcançada. A eficiência instantânea do uso da água (EUA) foi obtida através da razão entre a taxa fotossintética (*A*) e a taxa de transpiração (*E*). No final do período de estresse e após 24 horas de reidratação amostras foliares foram coletadas para determinação do conteúdo relativo de água (CRA) de acordo com a fórmula:

$$CRA = \frac{(MF - MS)}{(MT - MS)} \times 100$$

Sendo que, MF corresponde a massa fresca que foi obtida imediatamente após a remoção dos discos foliares, MT corresponde a massa túrgida determinada após a reidratação dos discos foliares por 3 h, e MS corresponde a massa seca obtida após a secagem dos discos em estufa de circulação forçada a 60°C por 48 h.

3.4) Determinações bioquímicas

As determinações bioquímicas foram realizadas no final do período de estresse e após 24 h de reidratação em folhas jovens totalmente expandidas. Os pigmentos fotossintéticos (clorofila e carotenóides) foram extraídos em acetona 80% e as suas concentrações calculadas de acordo com as fórmulas de Lichtenthaler (1987). A determinação do conteúdo de prolina foi feita em folhas secadas em estufa de circulação de ar a 60°C e trituradas em moinho de acordo com o método de Bates et al. (1973) e modificado por Torello e Rice (1986). Os valores de leitura obtidos a 520 nm foram comparados com uma curva padrão de prolina, e os resultados expressos em micromoles de prolina por miligrama de material seco de folhas (µmol

mg⁻¹). As determinações dos teores foliares de nitrato, amônio e nitrogênio total foram realizadas no Laboratório de Solos, situado no Departamento de Solos e Recursos Ambientais da Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP/Botucatu. As análises foliares de nitrogênio, nitrato e amônio se deram pelo método semimicro-Kjeldahl, após digestão sulfurosa das folhas secas e moídas de acordo com Malavolta et al. (1997).

3.5) Análise do Conteúdo Fenólico da Folha

Preparação do extrato:

Amostra de folhas de 24 espécimes de *A. cruentus* crescidas em diferentes condições de cultivo foram coletadas em triplicata e secas a 60°C. As folhas secas foram trituradas usando um moinho de faca e uma alíquota de 50 mg foi extraída usando MeOH:H₂O 85:15 (v/v), via ultrassom por 30 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 3000 rpm. A solução obtida foi submetida à extração em fase sólida em fase reversa (SPE-C₁₈) seguido de filtração em membrana PTFE (0,45 µm). As amostras foram analisadas aleatoriamente na concentração final de 3,5 mg ml⁻¹.

Análise HPLC-PAD:

Os extratos foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (PU-2089S Plus, Jasco®) acoplado a um detector de fotodiodos (MD-2015 Plus Jasco®) e injetor automático (MD AS-2055 Jasco®). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna Phenomenex® Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) a 40°C. A sistema da fase móvel consistiu em MeOH e água ultrapura, acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Synth®). As amostras foram analisadas usando um gradiente linear como segue: 5 a 65% de MeOH em água ultrapura em 65 minutos. A taxa de vazão foi de 1 ml min⁻¹.

3.6) Determinação de Matéria Seca

Ao final da imposição do tratamento de estresse hídrico (49 dias após a semeadura), foram selecionadas as plantas de cada tratamento aleatoriamente para determinação da matéria seca da parte aérea. As plantas de amaranto foram divididas em caule e folhas antes de serem secas em estufa a 60°C por pelo menos 48 h.

3.7) Análise Estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância Fatorial (2x2) usando-se o programa SPSS / PC para Windows 9.0. Os níveis tanto de nitrogênio quanto de água foram tratados como efeitos fixos e um teste univariado foi realizado em cada variável separadamente ao nível de 5%. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo procedimento da Diferença Mínima Significativa (DMS) a 5%. O procedimento da diferença mínima significativa para comparar as médias dos tratamentos foi realizado apenas para a variável com teste F significativo para os efeitos principais (N e água) e/ou sua interação. Os gráficos foram gerados através do programa Microcal Origin versão estudante. O procedimento de diferença mínima significativa (DMS) para comparação de médias dos tratamentos foi realizado apenas para a variável com teste F significativo para os efeitos principais (N e água) e/ou sua interação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as revisões bibliográficas e as análises realizadas no presente estudo, observou-se que a água e o nitrogênio atuam como os principais fatores limitantes para o crescimento da cultura e sua consequente produtividade.

Considerando as alterações climáticas em escala mundial que vem ocorrendo, é possível entender quais consequências seriam observadas com a diminuição drástica da disponibilidade hídrica, afetando amplamente a todos os seres vivos inseridos no meio ambiente. As plantas por exemplo, em sua maioria, costumam responder de forma positiva quanto ao aumento da disponibilidade de nitrogênio (ZUBILLAGA et al., 2019) e de forma negativa em relação a intensificação do estresse hídrico (KARIMI et al., 2018). Apesar de os estudos demonstrarem haver alterações das respostas fisiológicas e metabólicas do estresse hídrico nas plantas interagindo com diferentes níveis de disponibilidade de nitrogênio, os dados sobre os efeitos interativos de tais fatores (N e água) no desempenho do amaranto são limitados.

Ainda que o *Amaranthus* pudesse enquanto gênero sobreviver e se desenvolver em solos relativamente pobres nutricionalmente e com baixo aporte hídrico, é notável no presente estudo que, ao ser submetido sob os diferentes níveis

de concentração de nitrogênio (alta e baixa), ocorreu um aumento no investimento da planta para o desenvolvimento de matéria seca sob alta concentração de N em aproximadamente 168 % quando comparada com a baixa concentração de N, conforme visto na Figura 1.

Também pôde-se observar que sob alto suprimento de nitrogênio, o investimento em desenvolvimento de matéria seca foliar quase triplicou quando comparado com o baixo suprimento de nitrogênio, no qual a proporção entre caule e matéria seca foliar foi maior em folhas do que caule em alta concentração de N. Segudo Gastal e Nelson (1994), é provável que tal resposta esteja relacionada ao fato de que, sob elevado teor de nitrogênio, advém uma maior taxa de deposição de nitrogênio total na zona de crescimento das folhas, sugerindo assim que a taxa de expansão foliar é significativamente sensível às concentrações de nitrogênio em zonas de crescimento e expansão celular. Ademais, a elevada concentração de nitrogênio estimulou quase em 30 vezes a massa seca da inflorescência do tipo panícula, independentemente do aporte hídrico disponível, quando comparada a baixa concentração de nitrogênio, o que demonstra de acordo com Ruffy Jr. et al. (1990) uma estimulação da atividade meristemática. Os seis dias de estresse hídrico não foram suficientes para reduzir a matéria seca acima da superfície do solo, e nenhuma interação entre nitrogênio e estresse hídrico foi observada.

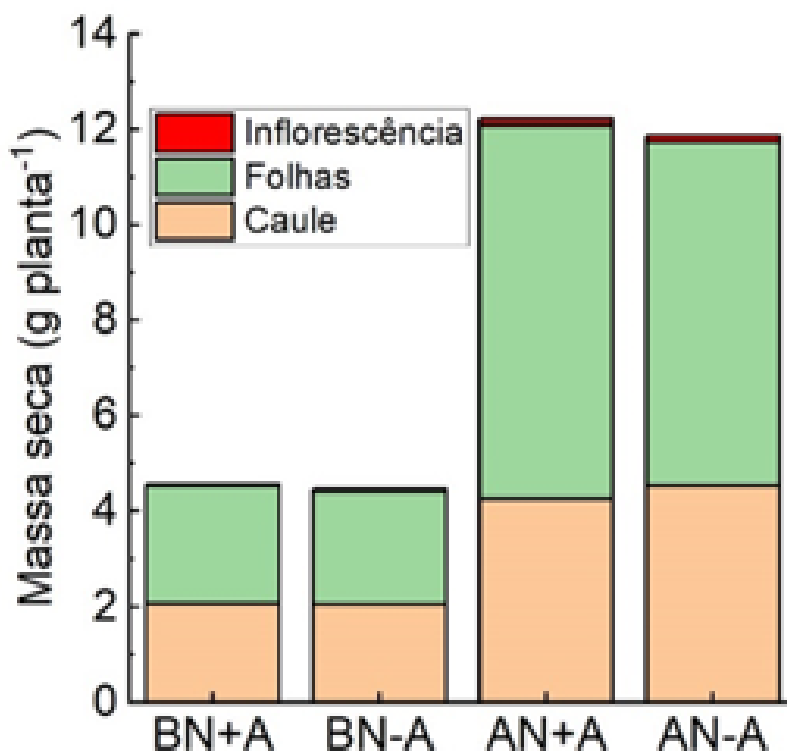


Figura 1: Partição de matéria seca da parte aérea de plantas de amaranth cultivadas sob baixo teor de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN-A), alto nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN-A) após 6 dias de estresse hídrico. Os valores são referentes à média $\pm$ erro de 10 plantas.

Já tendo em vista a importância do nitrogênio enquanto componente da molécula de clorofila, observa-se que o aumento nas concentrações de pigmentos seja decorrente de um maior aporte no que se refere às plantas que receberam uma maior quantidade de nitrogênio. A concentração das clorofilas *a* e *b* por exemplo, cresceram cerca de 200 e 189 %, respectivamente quando em comparação a menor disponibilidade de nitrogênio (Figura 2). Além disso, igualmente houve um aumento da proporção de *a/b* em 8 % sob elevado teor de nitrogênio, como resultado do maior efeito da clorofila *a*, o que sugere uma maior atividade do fotossistema II.

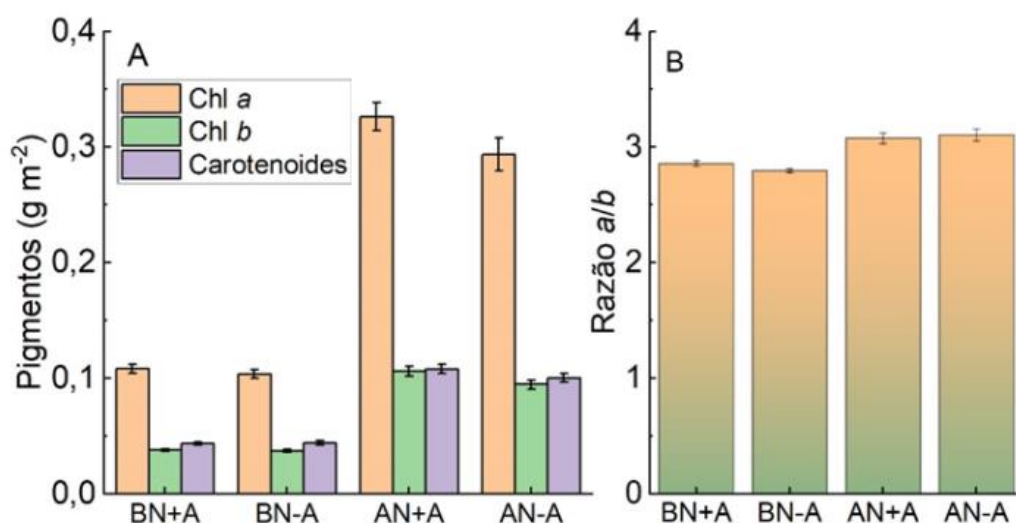


Figura 2: Pigmentos fotossintéticos (A) e razão entre clorofila *a/b* (B) de plantas de amaranto cultivadas sob baixo nível de nitrogênio e bem hidratadas (BN + A), baixo nível de nitrogênio e estressadas (BN – A), alto suprimento de nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN – A) após seis dias de estresse hídrico. Os valores são referentes a média $\pm$ erro de 6 plantas.

Os carotenóides, que funcionam como pigmentos acessórios captando luz, exercem um papel fundamental na fotoproteção do aparato fotossintético. Nota-se que, um maior suprimento de nitrogênio proporcionou um aumento consecutivo na concentração de carotenoides em cerca de 115 % em comparação com o baixo teor de nitrogênio. Não foi observado nenhum efeito interativo entre os fatores estresse hídrico e nitrogênio como observado nos pigmentos fotossintéticos na Tabela 1.

Em um estudo realizado por Song, Y. et al., (2019), com algumas plantas de milho, quando sujeitas ao estresse hídrico houve uma redução na concentração de clorofila *a* e *b*. Tal fato foi acentuado conforme aumentou-se o período de estresse hídrico, de cinco dias para dez dias (ALHAITHLOUL, 2019). Os resultados contraditórios em questão podem ser explicados devido às diferentes condições experimentais em adição com os diferentes gêneros utilizados pelos autores. Segundo evidenciado por Caser et al., (2018), os diferentes níveis de desidratação podem vir a induzir diferentes respostas no que se refere ao conteúdo de clorofila e carotenoides.

Tabela 1: Análise de variância fatorial que descreve a influência do suprimento de nitrogênio (N) e água (A) em várias características das plantas de amaranto. Os níveis de significância são: *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; NS, não significativo, - não determinado.

Variáveis	Final do Estresse			24h após a reidratação		
	N	A	NxA	N	A	NxA
Massa Seca	***	NS	NS	-	-	-
CRA	NS	*	*	NS	NS	NS
g_s	**	***	***	***	NS	NS
E	NS	***	***	***	**	*
A	*	***	***	***	*	NS
C_i	***	*	*	NS	**	NS
EUA	NS	***	**	***	NS	*
Chl <i>a</i>	***	NS	NS	-	-	-
Chl <i>b</i>	***	NS	NS	-	-	-
Chl <i>a/b</i>	***	NS	NS	-	-	-
Carotenoides	***	NS	NS	-	-	-

Como pode ser visto na Tabela 1 e na Figura 3, somente a restrição hídrica afetou o conteúdo relativo de água (CRA) da folha, contudo, quando houve a interação entre a disponibilidade dos fatores água e nitrogênio sobre tal variável, a restrição hídrica afetou o conteúdo relativo de água somente em plantas cultivadas sob alto teor de nitrogênio após os seis dias de estresse hídrico. As plantas cultivadas sob baixo teor de nitrogênio, após os seis dias de seca, mantiveram praticamente os mesmos níveis de conteúdo relativo de água em comparação com as plantas controle. Esta diferença no CRA sob os diferentes níveis de nitrogênio (alto e baixo) em relação ao estresse hídrico se dá em consequência do aumento significativo de biomassa foliar decorrente do elevado teor de nitrogênio disponível. A maior biomassa das folhas sob

alto teor de nitrogênio representou maior área de transpiração e, conseqüentemente, maior consumo de água disponível no substrato além do estímulo da taxa de transpiração (E) e condutância estomática (g_s) (Figura 5). Após 24 horas de reidratação, o CRA de plantas cultivadas com alto teor de nitrogênio se recuperou no mesmo nível que as plantas sem estresse (Figura 3; Tabela 1).

A disponibilidade de nitrogênio e água limitam as trocas gasosas, e a resposta estomática ao fornecimento de nitrogênio tem sido amplamente estudada, mas os resultados disponíveis são contraditórios. Sabe-se que a primeira resposta ao estresse hídrico é o fechamento imediato dos estômatos, a fim de evitar a perda de água inicialmente. Ainda que a deficiência de nitrogênio não tenha efeito em relação a condutância estomática (g_s) em algumas espécies (GRASSI et al., 2002), em outras a condutância estomática pode ser aumentada (CIOMPI et al., 1996) ou reduzida (SHAHROKHANIA E SEPASKHAH, 2017). No presente estudo, o nitrogênio elevado aumentou a g_s em cerca de 133% das plantas cultivadas em condições de água de torneira (Figura 5 A) em comparação com o baixo teor nitrogênio.

Logo, foi possível observar que conforme ocorre um aumento na condutância estomática, se dá conseqüentemente uma maior captação de CO_2 o que confere maior disponibilidade de CO_2 na cavidade subestomática, sendo gerada em contrapartida também uma maior quantidade de vapor d'água perdida pelos estômatos através do seu mecanismo de funcionamento. A restrição hídrica culminou na redução de g_s sob o fornecimento de nitrogênio, enquanto a interação entre os dois fatores resultou em uma maior diminuição em g_s sob alto nitrogênio comparado ao baixo nitrogênio (Tabela 1). Geralmente, alterações na condutância estomática são refletidas por meio de medidas das variações na taxa de transpiração (E). Embora somente o nitrogênio não tenha alterado significativamente E de acordo com a análise de variância, houve interação deste fator nas condições de estresse hídrico, como é possível observar na Tabela 1 e Figura 5 B. A restrição do abastecimento de água reduziu a taxa de transpiração tanto sob baixo quanto alto suprimento de nitrogênio, mas segundo a interação entre nitrogênio e estresse hídrico, a redução de E foi maior sob alto nitrogênio, semelhante aos estudos de Song, J. et al. (2019). Portanto, a combinação dos dois fatores resultou em respostas opostas na planta posto que se dá a abertura estomática conforme há alta disponibilidade de nitrogênio, e o conseqüente mecanismo de fechamento estomático a fim de evitar a perda excessiva

de água. O aumento da taxa de transpiração por m^{-2} sob alto teor de nitrogênio e uma maior produção de biomassa foliar resultou numa consequente intensificação da perda de água pela planta, promovendo assim um estresse mais rápido como observado no conteúdo relativo de água (CRA). Um ligeiro declínio na condutância estomática (g_s) e na taxa de transpiração (E) sob estresse hídrico moderado, como observado sob baixo teor de nitrogênio, pode apresentar efeitos protetivos contra a seca promovendo, portanto, economia de água uma vez que o CRA sob essa condição não sofreu alteração após os seis dias de restrição hídrica, como mostra a Figura 3.

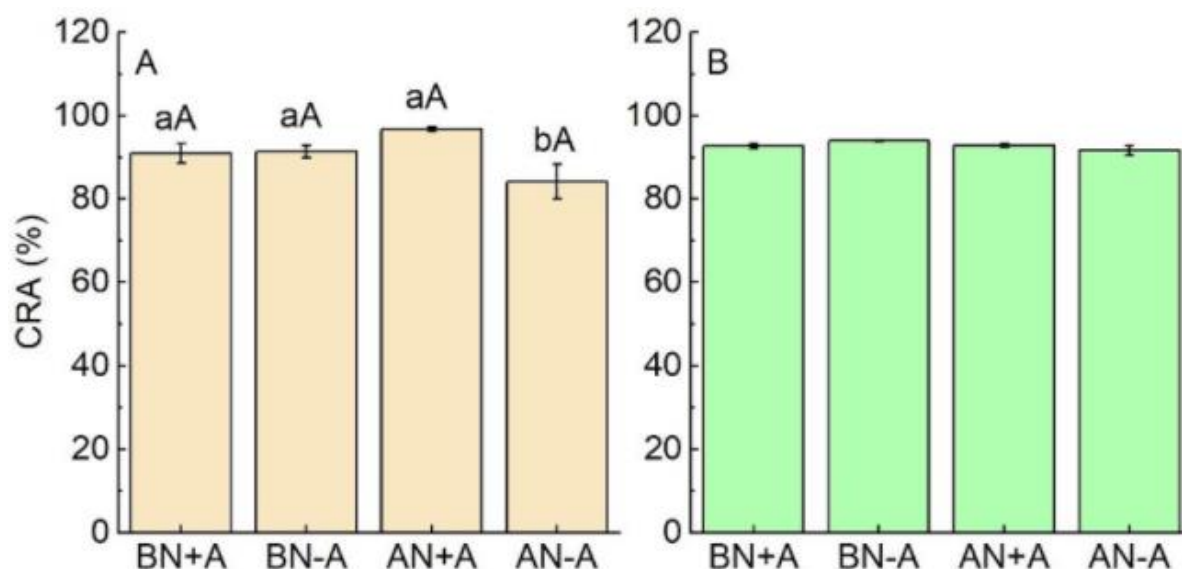


Figura 3: Conteúdo relativo de água (CRA) de plantas de amaranto cultivadas sob baixo teor de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN - A), alto nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN - A) após 6 dias de estresse hídrico (A) e 24 h após a reidratação (B). Os valores são a média $\pm$ erro de 5 plantas, respectivamente. A média seguida pelas mesmas letras minúsculas (para A em um determinado nível N) e letras maiúsculas (para N em um dado suprimento de A) não diferem significativamente em $P = 0,05$.

A eficiência do uso de água apresentou considerável redução sob condições de restrição hídrica e alto teor de nitrogênio decorrente de um efeito mais negativo na taxa fotossintética (A) do que na taxa de transpiração (E) como é possível constatar nas Figuras 4 e 5, e nas análises da Tabela 1. Assim, os resultados demonstrados no presente estudo em relação ao suprimento de nitrogênio em relação à fotossíntese (A) assemelham-se aos resultados encontrados em Poorter et al.,

(2009) sendo evidenciado que o menor suprimento de nutrientes, primordialmente o nitrogênio, afeta muito mais intensamente o crescimento da planta do que a sua taxa fotossintética. Também no presente estudo, foi observado que a matéria seca acima do solo sob baixo teor de nitrogênio foi reduzida em cerca de 63% enquanto A foi reduzida em apenas 38%, corroborando, portanto, com os resultados encontrados por Poorter et al., (2009). O suprimento mais alto de nitrogênio teve um efeito significativo estimulando A sob condições de elevada disponibilidade hídrica, enquanto sob estresse hídrico a taxa fotossintética diminuiu drasticamente para valores mais baixos do que em plantas cultivadas sob baixo teor de nitrogênio, independentemente do abastecimento de água (Figura 5 C).

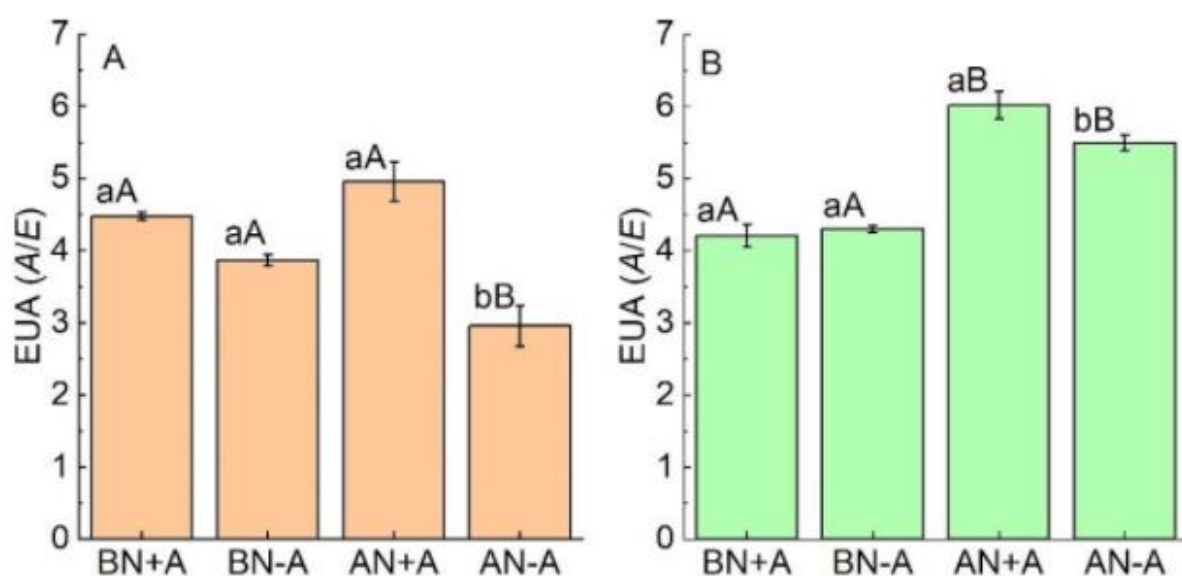


Figura 4: Eficiência do Uso de Água (EUA) de plantas de amaranto cultivadas sob baixa nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN - A), alto nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN - A) após 6 dias de estresse hídrico (A) e 24 h de reidratação (B). Os valores são a média $\pm$ erro 9 plantas. A média seguida pelas mesmas letras minúsculas (para A em um determinado nível N) e letras maiúsculas (para N em um dado suprimento de A) não diferem significativamente em $P = 0,05$.

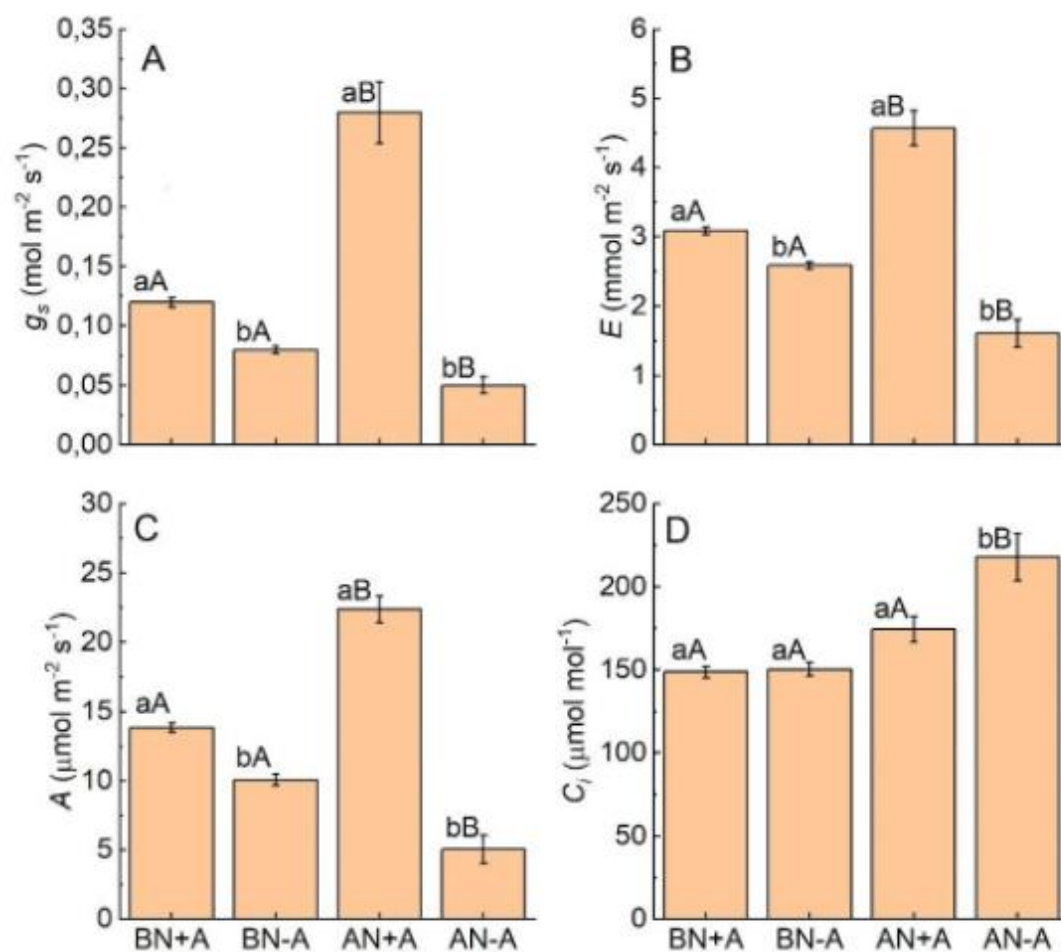


Figura 5: Condutância estomática (g_s , A), transpiração (E , B), fotossíntese (A , C) e concentração intercelular de CO_2 (C_i , D) de plantas de amaranto cultivadas sob baixo teor de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN - A), alto nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN - A) após 6 dias de estresse hídrico. Os valores são a média $\pm$ erro 9 plantas. A média seguida pelas mesmas letras minúsculas (para A em um determinado nível de N) e letras maiúsculas (para N em um dado fornecimento de A) não diferem significativamente em $P = 0,05$.

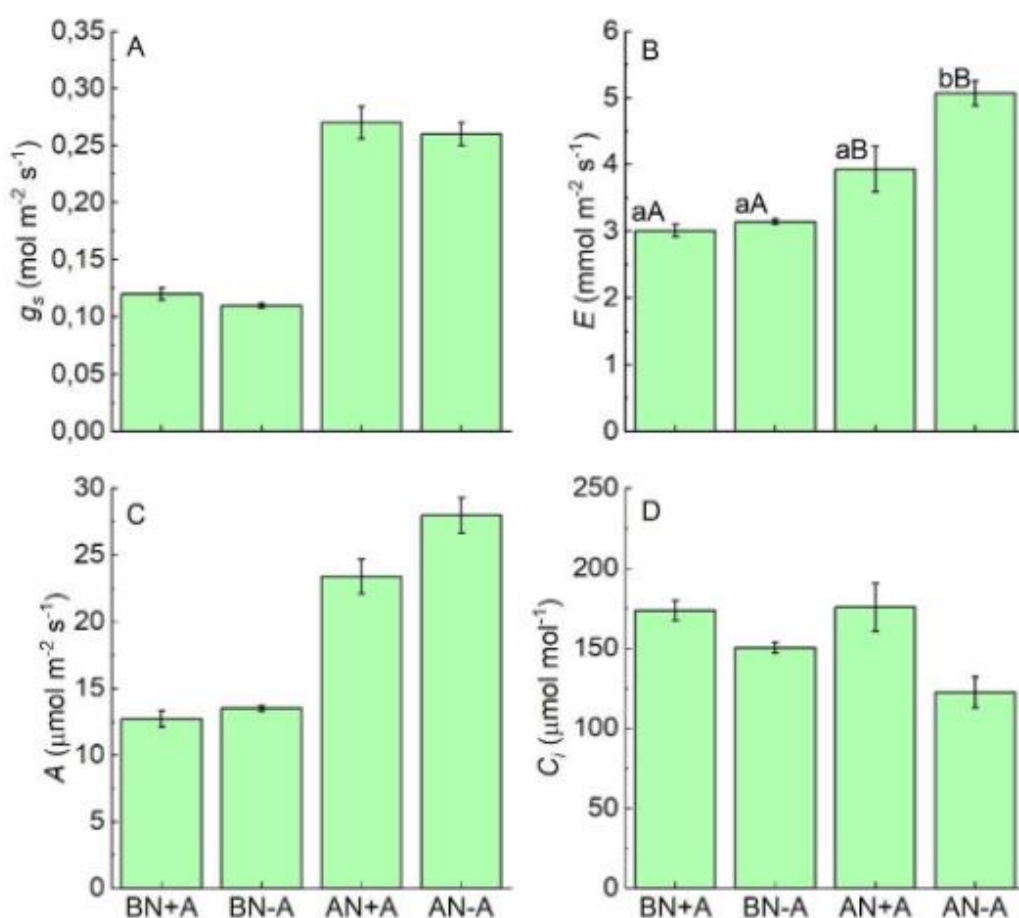


Figura 6: Condutância estomática (g_s , A), transpiração (E , B), fotossíntese (A , C) e concentração intercelular de CO_2 (C_i , D) de plantas de amaranto cultivadas sob baixo teor de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN - A), alto nitrogênio e bom abastecimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo abastecimento de água (AN - A) após 24 h de reidratação. Os valores são a média $\pm$ erro 9 plantas. A média seguida pelas mesmas letras minúsculas (para A em um determinado nível de N) e letras maiúsculas (para N em um determinado suprimento de A) não diferem significativamente em $P = 0,05$.

O maior efeito da seca sob alto teor de nitrogênio encontrado neste estudo indica que *A. cruentus* seria mais sensível à restrição hídrica nessa condição do que sob baixo suprimento de nitrogênio. Portanto, escolher a concentração adequada de nitrogênio pode resultar no aumento da resistência das plantas à seca (WANG et al., 2016).

A fotossíntese das espécies C_4 já atinge a saturação na concentração de CO_2 em torno de $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$ nos espaços intercelulares. Isso se deve à alta eficiência de carboxilação da enzima PEPCase em combinação com a inibição da

fotorrespiração promovida pelo mecanismo de concentração de CO_2 . A quantidade de CO_2 na cavidade subestomática depende da g_s e da condutância do mesofilo das cavidades subestomáticas para os cloroplastos advindo de processos metabólicos. Conforme observado na Tabela 1, o suprimento de nitrogênio e água afetaram a concentração intercelular de CO_2 (C_i), mas devido ao efeito de interação, o estresse hídrico aumentou o C_i sob alta disponibilidade de nitrogênio, não apresentando efeito sobre as plantas cultivadas sob baixo teor de nitrogênio (Figura 5 D). Embora a taxa de A sob alto teor de nitrogênio e alta disponibilidade de água tenha sido maior, o C_i apresentou um pequeno aumento de 17% (mas não significativo) quando comparado ao baixo nitrogênio, como também observamos na Figura 5 D. Tais resultados podem ser explicados pela condutância estomática mais elevada apresentada por essas plantas, portanto, resultando em mais CO_2 disponível na cavidade subestomática. A restrição do abastecimento de água não alterou o C_i sob baixo teor de nitrogênio. Contudo, o estresse hídrico sob alto teor de nitrogênio induziu um aumento no C_i de 25% em comparação com plantas não estressadas como resultado da interação entre os dois fatores (Tabela 1). Menores taxas de A sob estresse hídrico são, em geral, associados com menor condutância estomática (g_s). Embora a redução em g_s possa desempenhar um papel na limitação da fixação de CO_2 , ela não é a causa primária do declínio da atividade fotossintética sob alto teor de nitrogênio. Na verdade, C_i aumentou sob alto nitrogênio em plantas estressadas, sugerindo que a inibição de A não é resultado somente de limitação estomática.

Embora alguns autores tenham mostrado que o estresse hídrico diminuiu a concentração de clorofila (SARKER e OBA, 2018; BAYAT e MOGHADAM, 2019; SONG et al., 2019), o que poderia ser parcialmente responsável pela redução de A , não é o caso no presente estudo. O efeito da seca no amaranto em relação a A difere entre o suprimento de nitrogênio e pode ser parcialmente interpretado com relação ao maior aumento na biomassa das folhas, E e g_s . A maior quantidade de biomassa foliar sob alto teor de nitrogênio implica em mais área para transpiração e, consequentemente, representa um esgotamento mais rápido do estoque de água disponível no substrato. Essas inferências são respaldadas pela Figura 3, que demonstra uma redução significativa do CRA sob alto suprimento de nitrogênio quando comparado ao baixo suprimento de nitrogênio. Outrossim, o aumento de C_i sob alto nitrogênio e baixo suprimento de água sugere que a fotossíntese se encontra

sob controle do metabolismo do mesofilo, que reduziu a demanda por CO_2 . A inibição de A também pode ocorrer em resposta a uma redução na via de condutância do mesofilo das cavidades subestomáticas aos locais de carboxilação, resultando em menores pressões parciais de CO_2 nos cloroplastos (BARBOUR e KAISER, 2016), além da redução na eficiência fotoquímica do PSII como encontrado no milho, outra espécie do tipo C_4 (SONG et al., 2019). A redução de A também demonstrou estar associada à redução da atividade da Rubisco e de outras enzimas envolvidas na via C_4 (SICHER et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Após 24h de reidratação, a condutância estomática se recuperou totalmente sob baixo e alto suprimento de nitrogênio, enquanto E sob alto nitrogênio aumentou cerca de 29% quando comparado com plantas não estressadas (Figura 6 A, B; Tabela 1). Uma maior intensificação de E poderia ser explicada como uma tentativa de restabelecer o conteúdo relativo de água. Embora não significativo, após 24 h de reidratação, as plantas sob alta concentração de nitrogênio apresentaram um ligeiro aumento em A (Figura 6 C; Tabela 1). Após 24 h de reidratação, o C_i foi reduzido sob baixo e alto suprimento de nitrogênio, porém esta redução não foi estatisticamente significativa. A redução principalmente sob alto teor de nitrogênio pode ser explicada pela estimulação de A , consumindo assim rapidamente o C_i disponível na câmara subestomática. A eficiência do uso de água (EUA) não foi totalmente recuperada sob alto nitrogênio devido ao aumento significativo em E em comparação com A (Figura 4 B; Tabela 1). O fato de A ter sido totalmente recuperada após a reidratação indica que o dano ao aparato fotossintético não ocorreu sob este nível de estresse hídrico.

A quantidade de nitrogênio disponível está correlacionada diretamente com a fotossíntese, posto que com maior disponibilidade de nitrogênio e, portanto, maior biomassa foliar e maior concentração de pigmentos fotossintéticos ocorre também um aumento da capacidade fotossintética, e uma consequente translocação do nitrogênio traduzida em um maior acúmulo de massa seca (LAMPTEY et al., 2017; CECHIN e VALQUILHA, 2019). Em plantas cultivadas com alto teor de nitrogênio sob condições de abastecimento hídrico, o teor de nitrogênio total da folha aumentou 114% conforme visto na Figura 7 A, enquanto A aumentou cerca de 62% em comparação com o fornecimento de baixo teor de nitrogênio (Figura 5 C). A resposta positiva da fotossíntese (A) à aplicação de nitrogênio e o teor de nitrogênio foliar era esperado, uma vez que este nutriente está positivamente correlacionado com taxa fotossintética.

O aumento da fotossíntese está relacionado com o fato de que a maior quantidade de nitrogênio na folha localiza-se nos cloroplastos (EVANS, 1989) e ao efeito do alto teor de nitrogênio no desenvolvimento dos cloroplastos (BONDADA e SYVERTSEN, 2003).

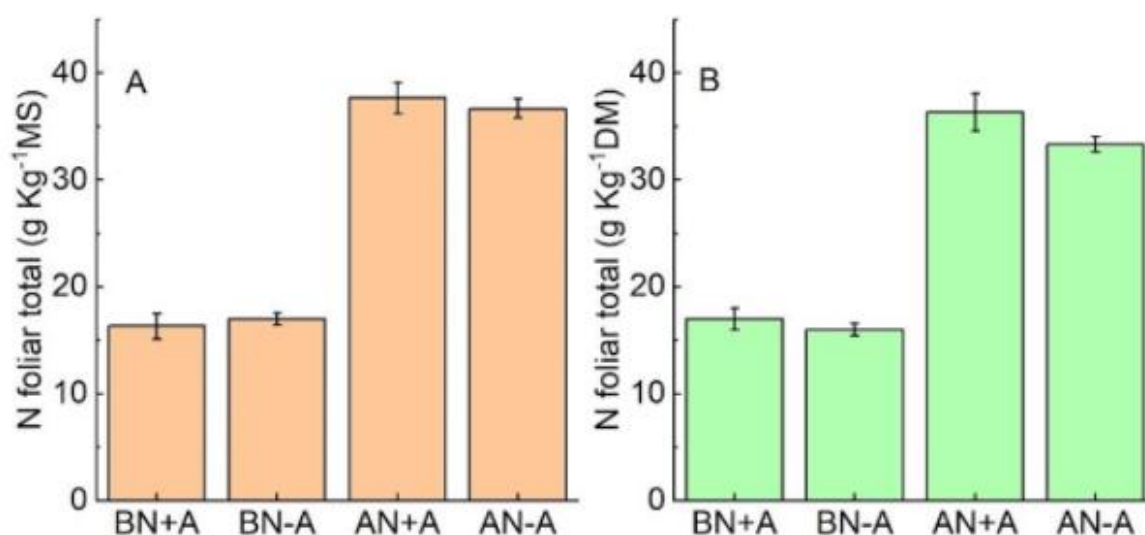


Figura 7: Concentração de Nitrogênio Foliar Total em plantas de amaranto cultivadas sob baixo teor de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN – A), alto suprimento de nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A), e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN – A) após 6 dias de estresse hídrico (A) e após 24h de reidratação (B). Os valores são a média $\pm$ erro de 3 plantas.

Além disso, em plantas C_4 crescidas com alto teor de nitrogênio, como o amaranto, há uma maior alocação de N na enzima Rubisco (TAZOE et al., 2006) e maior atividade da Rubisco e PEPcase (MA et al., 2017). À medida que a concentração de nitrogênio aumentou nas plantas de amaranto, os pigmentos fotossintéticos e o teor de nitrogênio nas folhas aumentaram paralelamente. Segundo um estudo realizado por Xiong et al. (2018), observou-se que o estresse hídrico por sete dias diminuiu significativamente a transpiração foliar e a concentração de nitrogênio na parte aérea, mas esse achado é inconsistente com os observados neste presente estudo. Como a restrição de água não reduziu os pigmentos fotossintéticos nem o teor de nitrogênio foliar, os resultados sugerem que uma alteração em A não advém de nitrogênio foliar inferior ou da presença de menos pigmentos fotossintéticos, mas sim devido a fatores bioquímicos e/ou fotoquímicos, além de qualquer

condutância estomática. O exato mecanismo que explica as taxas mais baixas de fotossíntese sob alto nitrogênio e estresse hídrico ainda não foi elucidado. É interessante que, sob uma boa nutrição de nitrogênio plantas que apresentam altos níveis de nitrogênio foliar não foram capazes de lidar com o efeito do estresse hídrico. Parece que, sob esta condição, o conteúdo relativo de água inferior nas folhas pode comprometer a atividade das enzimas envolvidas na fotossíntese como apontado por alguns autores (SICHER et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Sob uma variedade de complexos estressores, o acúmulo de solutos ativos compatíveis, como a prolina, é considerado um mecanismo eficaz de tolerância a tensões ambientais. A prolina funciona como um osmoprotetor e como um agente antioxidante em condições de estresse (KAVI KISHOR E SREENIVASULU, 2014). O acúmulo de prolina sob estresse hídrico foi encontrado em várias plantas como visto por Bayat e Moghadam (2019), observado principalmente nas folhas jovens (CECHIN et al., 2006). De acordo com Alhaithloul (2019), o acúmulo de prolina torna-se maior à medida que o período de estresse é aumentado. Além disso, foi observado que a aplicação foliar de prolina amenizou os efeitos adversos do estresse hídrico sobre o crescimento e a capacidade fotossintética de duas cultivares de milho (ALI et al., 2007). O acúmulo de osmólitos em células vegetais pode, portanto, ser importante na manutenção de vários processos fisiológicos em operação, mesmo sob condições estressantes. Ademais, descobriu-se que a prolina é o principal metabólito antioxidante não enzimático em condições de estresse hídrico, resultando em tolerância ao estresse como consequência de sua capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GUHA et al., 2012). Dado que a prolina é um aminoácido e, portanto, contém nitrogênio em sua composição, um aumento em sua síntese era esperado sob alto suprimento de nitrogênio (Figura 8 A; Tabela 2).

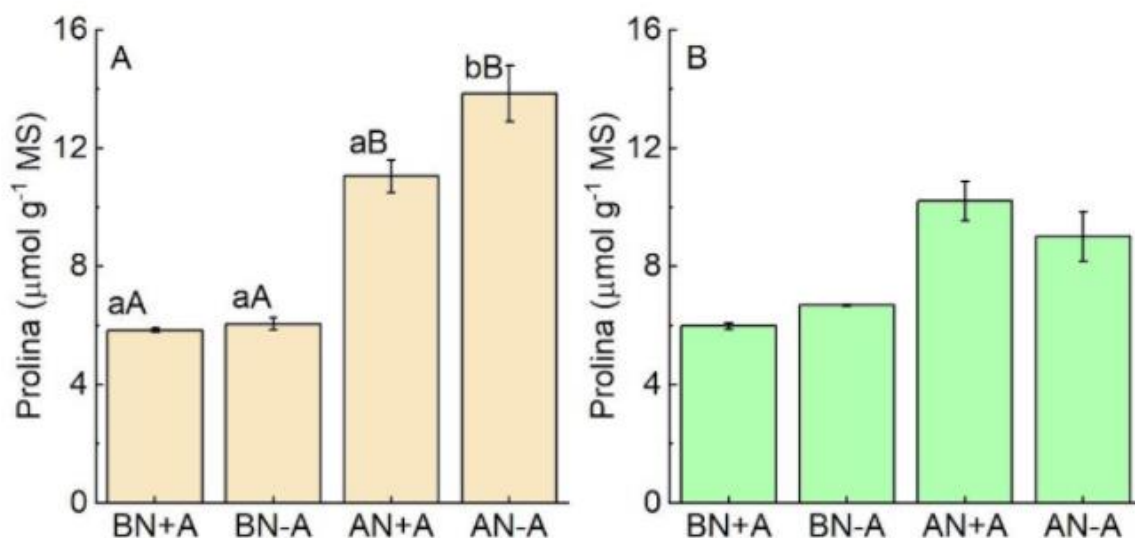


Figura 8: Concentração de prolina em plantas de amaranto cultivadas sob baixo teor de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN – A), alto suprimento de nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A), e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN – A) após 6 dias de estresse hídrico (A) e após 24h de reidratação (B). Os valores são a média $\pm$ erro de 4 plantas. A média seguida pelas mesmas letras minúsculas (para A em um determinado nível de N) e letras maiúsculas (para N em um determinado suprimento de A) não diferem significativamente em $P = 0,05$.

Tabela 2: Análise de variância fatorial que descreve a influência do fornecimento de nitrogênio (N) e de água (A) em várias características da planta do amaranto. Os níveis de significância são iguais aos da tabela 1.

Variáveis	Final do Estresse			24h após a reidratação		
	N	A	NxA	N	A	NxA
Prolina	***	*	*	***	NS	NS
Nitrogênio Foliar	***	NS	NS	***	NS	NS
Amônio	***	NS	NS	***	NS	NS
Nitrato	***	**	**	***	NS	NS

O aumento da prolina em plantas com alto teor de nitrogênio foi maior em comparação com o baixo teor de nitrogênio em condições de alta disponibilidade hídrica. Sob menor teor de nitrogênio, não houve diferença entre plantas bem irrigadas e estressadas. No entanto, à medida que a disponibilidade de nitrogênio foi aumentada, houve um aumento significativo na concentração de prolina. Não é surpreendente que com baixo teor de nitrogênio não houvesse aumento significativo na prolina, uma vez que o estresse hídrico nessa condição ocorreu de forma mais lenta, sem mudanças significativas no CRA. Portanto, aparenta ser bastante provável que o aumento da prolina ocorre de forma a atuar como um mecanismo protetor em resposta aos efeitos prejudiciais da seca.

A quantidade de prolina acumulada durante a seca foi considerada dependente da sensibilidade das espécies e genótipos do *Amaranthus* ao estresse hídrico (SLABBERT e KRUGER, 2014; SARKER e OBA, 2018) e dependente do nível de nitrogênio disponível como estudado por Zhong et al., (2017) em folhas de arroz. Após 24 h de reidratação, houve o restabelecimento dos níveis de prolina, o que demonstrou ter ocorrido somente o efeito do nitrogênio conforme a Figura 8 B e a Tabela 2.

É sabido que as principais fontes de nitrogênio para a maioria das espécies são o nitrato e amônio, sendo o nitrato a preferência da maioria destas (ANDREWS et al., 2013). Então, quando o suprimento de nitrogênio é ideal, uma quantidade considerável de nitrato é armazenada em vacúolos, podendo ser reutilizado quando o nitrogênio se torna limitado. O nitrato absorvido pelas raízes é assimilado nas mesmas ou transportado para partes aéreas, dependendo da disponibilidade e das espécies de plantas. A assimilação resulta na transformação do nitrato em nitrito e posteriormente em amônio. Tanto o amônio absorvido pelas raízes quanto o amônio produzido no processo de assimilação é convertido em glutamina e depois glutamato para que ocorra a produção de compostos orgânicos variados. Uma grande variabilidade natural de acúmulo de nitrato foi encontrada entre espécies de plantas e cultivares de uma mesma espécie (M'HAMDI et al., 2016; RAZGALLAH et al., 2016; SAREER et al., 2016). No presente estudo, grandes acúmulos de nitrato foliar foram encontrados quando as plantas receberam maior suprimento de nitrogênio devido ao excesso na absorção em decorrência da maior disponibilidade de nitrogênio no solo em relação à capacidade de transformação em compostos orgânicos (Figura 9 A;

Tabela 2). As folhas de *A. cruentus* apresentaram um acúmulo de nitrato de 579,5 mg kg⁻¹ de massa seca. Após seis dias de estresse hídrico, as plantas com alto teor de nitrogênio atingiram uma concentração mais baixa de nitrato do que as folhas correspondentes de plantas sem estresse, sem efeito sobre o baixo teor de nitrogênio (Figura 9 A; Tabela 2).

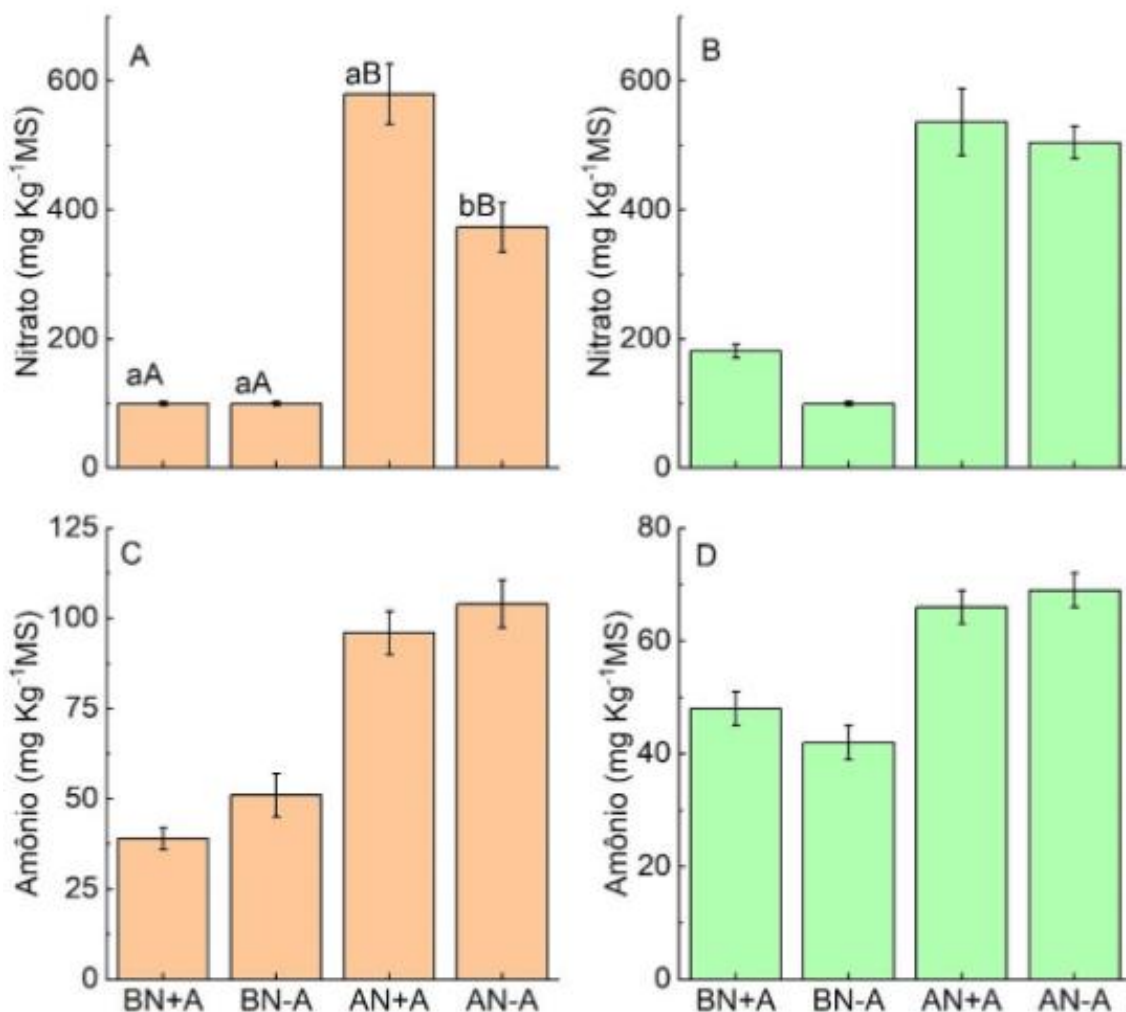


Figura 9: Concentrações de nitrato foliar (A, B) e amônio (C, D) em plantas de amaranto cultivadas sob baixo suprimento de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN – A), alto nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN – A) após 6 dias de estresse hídrico (A) e após 24h de reidratação (B). Os valores são a média $\pm$ erro de 3 plantas. A média seguida pelas mesmas letras minúsculas (para A em um determinado nível de N) e letras maiúsculas (para N em um determinado suprimento de A) não diferem significativamente em $P = 0,05$.

As plantas geralmente acumulam amônio quando nutridas com amônio como a única forma de nitrogênio. Embora as plantas tenham recebido doses iguais de nitrato e amônio, também houve acúmulo de amônio nas folhas (Figura 9 C; Tabela 2), indicando a saturação das enzimas participantes na assimilação de nitrogênio em compostos orgânicos. As plantas possuem adaptação para tolerar altos níveis de nitrato em seus tecidos sem efeitos prejudiciais, entretanto altos níveis de amônio são tóxicos para elas, resultando na redução do seu crescimento (LASA et al., 2001). Apesar do acúmulo de amônio nas folhas, nenhum efeito tóxico foi observado em *A. cruentus* após 6 dias de restrição hídrica.

Inúmeros fatores ambientais, como a seca, podem alterar a absorção e a assimilação do nitrogênio pelas plantas posto que a água é necessária para a absorção e utilização do nutriente em questão. De fato, conforme observado por Wang et al., (2019), grandes aberturas estomáticas em cultivares de macieiras resistentes à seca promoveram um aumento da taxa de transpiração (E), que culminou numa maior absorção de nitrogênio. Uma taxa de secreção do xilema relativamente alta e de transpiração, que é a principal via de perda de água das folhas, foram observadas com suprimento moderado e alto de nitrogênio, mas sob estresse hídrico foram significativamente suprimidos em todos os níveis de nitrogênio (ZHONG et al., 2017), sem alteração no nitrogênio foliar total. Embora neste estudo a maior disponibilidade de nitrogênio tenha aumentado g_s e E sob maior disponibilidade de água, sob seca eles foram significativamente reduzidos, sugerindo uma limitação na absorção e translocação do mineral através do xilema na transpiração. O estresse hídrico e o metabolismo do nitrogênio têm efeitos interativos e, conseqüentemente, o metabolismo do nitrogênio afeta uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas de grande importância para a tolerância das plantas à seca (LAWLOR, 2002).

A atividade enzimática do metabolismo do nitrogênio foi intensificada sob um suprimento adequado de nitrogênio quando comparada à baixa disponibilidade, mas a atividade da nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) foram reduzidas pelo estresse hídrico sob o suprimento de nitrogênio (SONG et al., 2019). Outros autores também demonstraram que o estresse hídrico leva à diminuição das atividades das enzimas NR, GS e glutamato sintase (GOGAT) que estão envolvidas na assimilação de nitrogênio (PAWAR et al., 2015). Segundo Song, Y. et al. (2019), o conteúdo de nitrato e a atividade da NR nas folhas de milho foram significativamente

reduzidos sob estresse hídrico, enquanto o fornecimento moderado de nitrogênio promoveu o acúmulo de nitrato e aumento da atividade da NR. Concluíram, portanto, que o fornecimento moderado de nitrogênio aumenta a resistência das plantas ao estresse hídrico, enquanto altas ou baixas concentrações de nitrogênio aumentam a sensibilidade do milho ao estresse hídrico. Xiong et al. (2018) descobriu que houve um efeito interativo significativo entre nitrogênio e estresse hídrico sobre os teores de nitrato e amônio nas folhas de plantas cultivadas sob alta disponibilidade de nitrogênio, apresentando teores significativamente menor e maior sob estresse hídrico, respectivamente. Os autores atribuíram ao acúmulo de amônio nas folhas sob a seca e alto teor de nitrogênio a um incremento na atividade da NR e uma redução da atividade da g_s , revelando que um aumento do acúmulo de amônio sob a seca pode ser atribuído à maior redução do nitrato. Este não é o caso neste estudo, uma vez que sob alta disponibilidade de nitrogênio e restrição hídrica, o menor teor de nitrato não foi acompanhado com um aumento de amônio nas folhas. Parece que, pelo fato de não ter ocorrido alteração no teor de N total da folha, houve um desvio de N para a síntese de prolina. O estudo de Slabbert e Kruger (2014) sugeriu que a prolina pode atuar como um composto de armazenamento de carbono e nitrogênio durante o estresse hídrico, quando a síntese de amido e proteína são inibidas. Pesquisas adicionais são necessárias para esclarecer esta resposta em *A. cruentus*.

Existem evidências abundantes de que o déficit hídrico pode alterar o metabolismo do nitrogênio, mas o efeito varia de acordo com as espécies e a intensidade do estresse. Por exemplo, em *Hippophae rhamnoides*, os dois níveis de estresse hídrico (50% e 30% da capacidade do campo por 12 semanas) diminuíram a absorção de nitrogênio na forma de amônio e nitrato, enquanto inibiu somente a absorção do nitrato em *H. thibetana* (CHEN et al., 2019). Também conforme encontrado por Huang et al. (2018), o fluxo líquido de nitrato na superfície da raiz foi menor em resposta ao estresse hídrico, enquanto o fluxo de amônio tendeu a aumentar ao longo das raízes finas de *Malus prunifolia* tratada com PEG. Tais descobertas explicam o menor teor de nitrato nas folhas de *A. cruentus*, mas não o nível de amônio que permaneceu inalterado sob o estresse hídrico. Após 24 h de reidratação, o nível de nitrato sob alto teor de nitrogênio foi reestabelecido (Figura 9 B; Tabela 2). No presente estudo, nem o estresse hídrico nem a reidratação alteraram o nível de amônio nas folhas (Figura 9 C, D; Tabela 2).

As plantas sintetizam uma grande variedade de metabólitos especializados derivados do metabolismo primário. Foi sugerido que os recursos disponíveis, como nitrogênio, carbono e enxofre teriam impacto sobre a produção de classes específicas de metabólitos primários que, por sua vez, sintetizam metabólitos especializados, indicando redes de expressão gênica supercoordenadas, conectando o metabolismo primário e especializado em plantas (AHARONI e GALILI, 2011). Os compostos fenólicos, que são encontrados principalmente no vacúolo de vários tipos de células nas folhas, atuam como metabólitos especializados sob estresses abióticos (KARABOURNIOTIS et al., 2014). A capacidade fotossintética é negativamente correlacionada com a concentração de compostos fenólicos foliares (SUMBELE et al., 2012) e isso foi sugerido para representar o gradiente entre um ganho máximo de carbono e a máxima proteção (KARABOURNIOTIS et al., 2014), refletindo um balanço entre a demanda para crescimento e defesa/proteção, dependendo da estratégia de crescimento adotada por cada espécie (SUMBELE et al., 2012). Metabólitos especializados, como os compostos fenólicos, são utilizados como importantes antioxidantes não enzimáticos em plantas, atuando em conjunto com a peroxidase vacuolar de classe III (FERRERES et al., 2011), e agindo também como antioxidantes para as ROS e, consequentemente estabilizando a membrana da célula a fim de prevenir a peroxidação de lipídios (DI FERDINANDO et al., 2014). Os flavonóides e fenóis totais estão positivamente correlacionados com o teor de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, indicando que estão envolvidos no reparo da peroxidação lipídica da membrana sob estresse hídrico (WANG et al., 2019). Vários autores descobriram que plantas com estresse hídrico demonstraram um aumento nos fenóis totais e flavonóides (STAGNARI et al., 2014; CASER et al., 2018; BAYAT e MOGHADAM, 2019), sugerindo que o aumento da síntese dessas substâncias pelas plantas representa um importante mecanismo de defesa da tolerância à seca (SENAD et al., 2018). Tem sido sugerido que a biossíntese de flavonóides ocorre predominantemente quando as enzimas antioxidantes são inativadas (FINI et al., 2011).

No presente estudo, as plantas de *A. cruentus* cultivadas sob baixo e alto teor de nitrogênio foram estressadas por meio da interrupção completa da irrigação durante seis dias. Os picos presentes no cromatograma foram identificados como ácidos fenólicos e como flavonóides baseados na comparação dos espectros de

absorção em UV com os padrões disponíveis (Figura 10). As áreas de cada um dos picos detectados foram obtidas e os cálculos extrapolados, sendo a quantificação expressa em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de extrato seco. As médias obtidas para cada grupo experimental e classes de substâncias são apresentadas na Figura 11. O coeficiente de variação, que é uma medida de dispersão das variáveis, foram em geral altas conforme visto na Tabela 3, o que significa que quanto maior o coeficiente de variação, maior o nível de dispersão em torno da média. A análise de variância fatorial apresentada na Tabela 3 mostra que o estresse hídrico não alterou significativamente o teor de ácidos fenólicos, fenóis totais ou flavonóides. Pelo contrário, o nitrogênio elevado reduziu a concentração de flavonóides e fenóis totais independentemente do estresse hídrico. A concentração total de fenóis de plantas *Beta vulgaris* em condições de carência de N foi maior nas folhas e raízes, em comparação com o fornecimento de nitrogênio padrão (SALAHAS et al., 2011). Este resultado é semelhante aos encontrados neste estudo para amaranto que pertence à mesma família. O efeito do aumento do nitrogênio nas plantas de *Lactuca sativa* reduziu todos os tipos de compostos fenólicos (QADIR et al., 2017). Visto que a capacidade fotossintética é negativamente correlacionada com a concentração de fenóis foliares (SUMBELE et al., 2012), isto pode explicar parcialmente a menor concentração de fenóis totais e flavonóides sob alto suprimento de nitrogênio neste estudo. Após 24 h de reidratação, apenas o nitrogênio teve um efeito pequeno e significativo sobre o conteúdo de ácidos fenólicos e flavonóides (Figura 11 B). O teor de ácidos fenólicos apresentou um pequeno aumento, enquanto os flavonóides permaneceram menores após 24 h de reidratação quando comparado com baixo suprimento de nitrogênio.

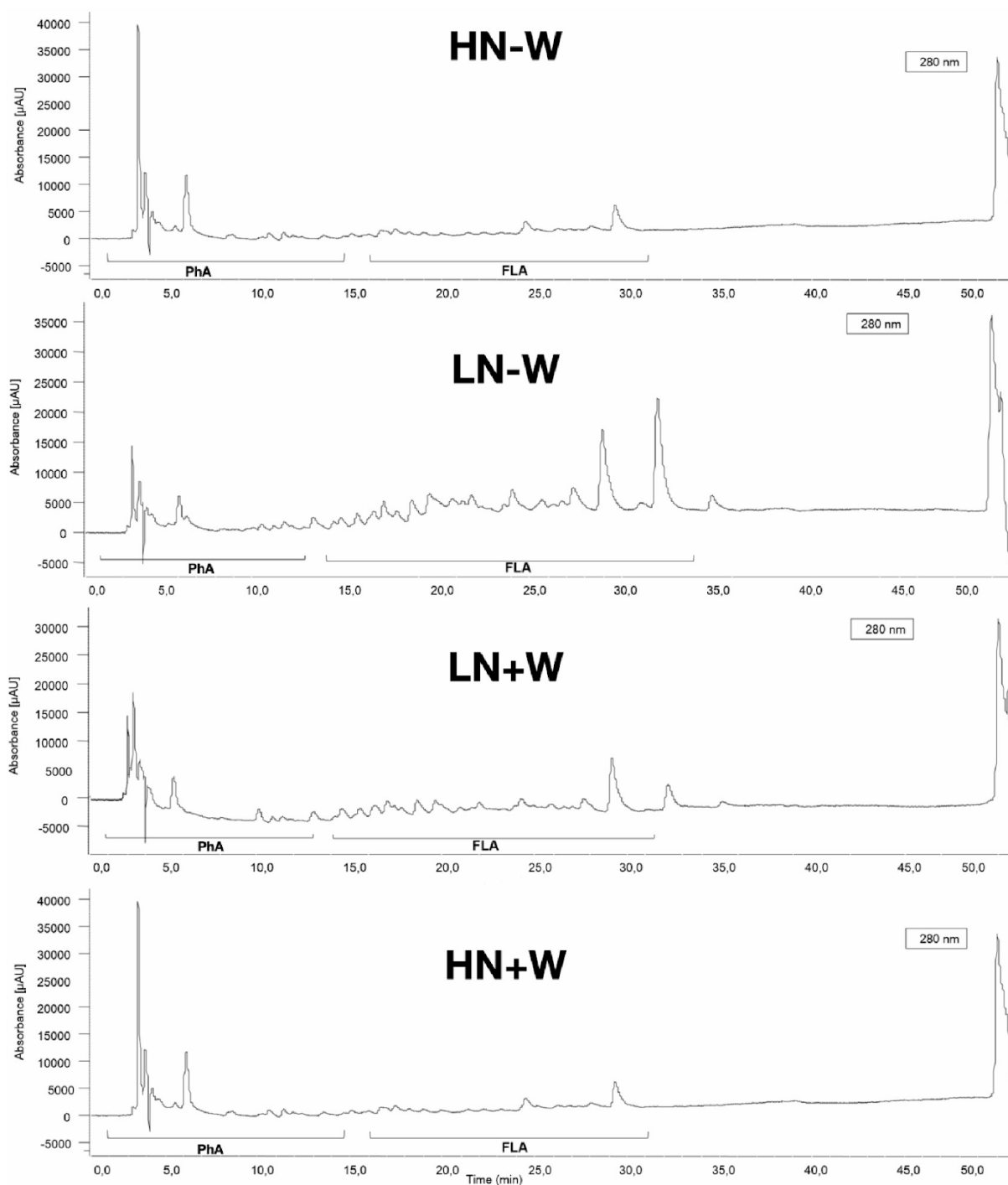


Figura 10: Cromatogramas analíticos representativos obtidos por HPLC-PAD do extrato de folhas de com 85% MeOH de plantas de amaranto cultivadas sob diferentes condições de fornecimento de nitrogênio e água. Os picos no cromatograma foram identificados como ácidos fenólicos (PhA) e flavonoides (FLA) com base nos padrões de absorção UV-vis por meio da análise PAD.

Legenda: plantas com alto nitrogênio e estressadas (HN - W), baixo nitrogênio e estressadas (LN - W), baixo nitrogênio e bem hidratadas (LN + W) e alto nitrogênio e bem hidratadas (HN + W).

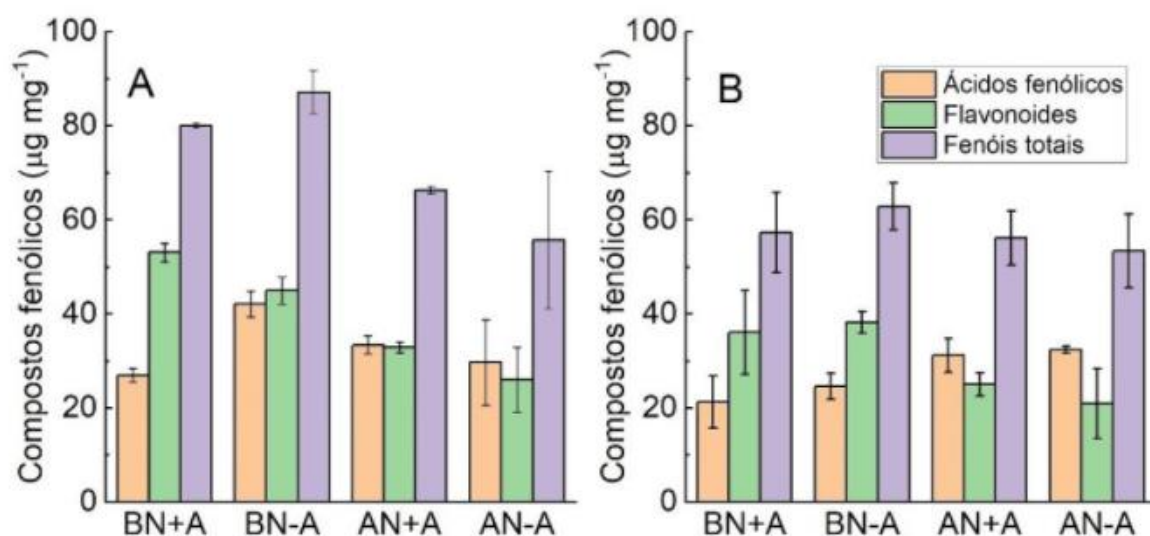


Figura 11: Conteúdo de ácidos fenólicos, flavonoides e fenóis totais em g/mg de 85% de MeOH extrato de folhas de plantas de amaranto cultivadas sob baixo teor de nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN – A), alto suprimento de nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A), e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN – A) após 6 dias de estresse hídrico (A) e após 24h de reidratação (B). Os valores são a média $\pm$ erro de 3 plantas. A média seguida pelas mesmas letras minúsculas (para A em um determinado nível de N) e letras maiúsculas (para N em um determinado suprimento de A) não diferem significativamente em $P = 0,05$.

Tabela 3: Coeficiente de variação e análise de variância que descreve a influência de fornecimento de nitrogênio (N) e água (A) em compostos fenólicos de plantas de amaranto cultivadas sob baixo nitrogênio e bom suprimento de água (BN + A), baixo nitrogênio e baixo suprimento de água (BN - A), alto nitrogênio e bom suprimento de água (AN + A) e alto nitrogênio e baixo suprimento de água (AN - A) após 6 dias de estresse hídrico (A) e 24 h de reidratação. Os níveis de significância são como na Tabela 1.

Variáveis	Final do Estresse				24h após a reidratação			
Coefficiente de variação %	BN+A	BN-A	AN+A	AN-A	BN+A	BN-A	AN+A	AN-A
Ácidos Fenólicos	9.4	11.3	10.0	52.9	44.8	19.7	19.5	4.1
Flavonoides	6.4	11.2	5.9	46.0	42.7	10.2	17.2	61.2
Fenóis Totais	1.2	9.0	2.1	45.0	25.8	13.8	17.0	25.4

Variância fatorial ANOVA

Fonte de variação	N	A	NxA	N	A	NxA
Ácidos Fenólicos	NS	NS	NS	*	NS	NS
Flavonoides	**	NS	NS	*	NS	NS
Fenóis Totais	*	NS	NS	NS	NS	NS

O estresse hídrico é um dos principais fatores responsáveis por alterações na fisiologia e no conteúdo de fitoquímicos nas plantas (KANNAN et al., 2011). No presente estudo, as plantas sob restrição hídrica apresentaram caule com cor púrpura mais intensa sob o suprimento de nitrogênio quando comparado às condições de disponibilidade hídrica (Figura 12). O aumento da quantidade de betacianina foliar sob estresse hídrico foi observado após dois dias de restrição hídrica em *A. cruentus*, proporcionando uma fotoproteção adicional, atenuando o excesso de luz nas folhas com estresse hídrico (NAKASHIMA et al., 2011). A seca induziu uma concentração significativamente maior de betalaínas na beterraba vermelha (STAGNARI et al., 2014; SITOMPUL e ZULFATI, 2019). Uma vez que o estresse hídrico induz estresse oxidativo e as betalaínas têm alta atividade de eliminação de radicais (GANDIA-HERRERO et al., 2016), um aumento nesses pigmentos pode ser esperado.



Figura 12: Segmentos de caule coletados no final do período de estresse evidenciando a pigmentação de Betalaínas. Sequência da esquerda para direita: AN + A; AN - A; BN + A; BN - A.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A função reguladora do nitrogênio na tolerância à seca da planta depende de fatores múltiplos, como a intensidade do estresse, o nível de nitrogênio e as espécies de plantas. No presente trabalho, notou-se que o alto suprimento de nitrogênio resultou em melhor desempenho das plantas de *A. cruentus*. De fato, sob esta condição satisfatória, as plantas não precisaram investir em metabólitos especializados de defesa, como os compostos fenólicos, que foram reduzidos sob esta condição. Contudo, um curto período de restrição hídrica (seis dias) causou uma redução significativa no CRA, características de troca gasosa, EUA e nitrato foliar, mas a concentração de prolina foi aumentada, porém sem aumentar os compostos fenólicos. A interação observada entre o nitrogênio e o suprimento de água não resultou em alívio dos efeitos do estresse hídrico sobre *A. cruentus*, ao contrário, causou a intensificação do mesmo. Em suma, o trabalho apresentado aqui indica que as respostas do amaranto ao estresse hídrico são provavelmente influenciadas pelo *status* de nitrogênio. Dada a importância do gênero *Amaranthus* como alimento e a necessidade de utilizar fertilizante de nitrogênio a fim de aumentar a produtividade da cultura, é desejável uma compreensão mais completa dos efeitos de interação entre o nitrogênio e o suprimento de água. Logo, estudos adicionais especialmente em relação a possíveis alterações fisiológicas e bioquímicas nas plantas de amaranto devido a interação entre nitrogênio e abastecimento de água, são necessários para um conhecimento mais profundo e preciso. A compreensão dos efeitos interativos entre disponibilidade de nitrogênio e água promoveu base científica para melhorar o rendimento da cultura do amaranto em resposta às flutuações nas condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- ALHAITHLOUL, H. A. S. Impact of combined heat and drought stress on the potential growth responses of the desert grass *Artemisia sieberi alba*: Relation to biochemical and molecular adaptation, **Plants**, v. 8, p. 416, 2019.
- ALI, Q.; ASHRAF, M.; ATHAR, H.-U.-R. Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions, **Pakistan Journal of Botany** v. 39, p. 1133-1144, 2007.
- ALVES DA COSTA, D. M. **Crescimento e desenvolvimento do Amarantho (*Amaranthus spp.*) sob estresse salino e cobertura morta**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, p. 43-48, 2008.
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface, **Current opinion in biotechnology** v. 22, p. 239-244, 2011.
- AMAYA-FARFAN, J.; MARCÍLIO, R.; SPEHAR, C. R. Deveria o Brasil investir em novos grãos para a sua alimentação? A proposta do amarantho (*Amaranthus* sp). **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 12, n. 1, p. 47-56, 11, 2005.
- ANDREWS, M.; RAVEN, J.; LEA, P. Do plants need nitrate? the mechanisms by which nitrogen form affects plants, **Annals of applied biology** v.163, p. 174-199, 2013.
- ANGHINONI, I. Adubação nitrogenada nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: SANTANA, M.B.M. **Adubação nitrogenada no Brasil** Ilhéus: CEPLAC/SBSC, p. 1-18, 1986.
- ANJANA, A.; UMAR, S.; LQBAL, M. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. **A review**, v.27, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1051/agro:2006021>.
- AYODELE, V. I. Influence of soil water stress at different physiological stages on growth and seed yield of *Amaranthus* species. **Acta Hort.**, v. 537, p. 767-772, 2001.
- BARBOUR, M. M.; KAISER, B. N. The response of mesophyll conductance to nitrogen and water availability differs between wheat genotypes, **Plant science** v. 251, p. 119-127, 2016.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BAYAT, H.; MOGHADAM, A. N. Drought effects on growth, water status, proline content and antioxidant system in three *Salvia nemorosa* L. cultivars, **Acta Physiologiae Plantarum** 41, p. 149, 2019.

BONDADA, S. R.; SYVERTSEN, J. P. Leaf chlorophyll, net gas exchange and chloroplast ultrastructure in citrus leaves of different nitrogen status, **Tree Physiology**, v. 23, p. 553-559, 2003.

BROWN, R.H. A difference in nitrogen use efficiency in C₃ and C₄ plants and its implications in adaptation and evolution. **Crop Science**, p. 93-98, 1978.

BREENE, W. M. Food uses of grain amaranth. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 36, n. 5, p. 426-429, 1991.

BRESSANI, R. Amaranth. The nutritive value and potential uses of the grain and by-products. **Food and Nutrition Bulletin**, Tokyo, v. 11, n. 2, p. 49-59, 1988.

CASELATO-SOUSA, V.M.; AMAYA-FARFÁN, J. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. **Journal of food science**, v. 77, p. 93-104, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02645.x>

CASER, M. *et al.* Ecophysiological and phytochemical responses of *Salvia sinaloensis* fern. to drought stress, **Plant Growth Regulation** v. 84, p. 383-394, 2018

CASTRO, A.H.F. *et al.* Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville **Ciência Florestal**, v. 27, p. 1037–1048, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509828679>

CECHIN, I. *et al.* Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit, **Photosynthetica** v. 44, p. 143, 2006.

CECHIN, I.; VALQUILHA, É.M. Nitrogen effect on gas exchange characteristics, dry matter production and nitrate accumulation of *Amaranthus cruentus* L. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, p. 373–381, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-019-00542-1>

CHEN, J. *et al.* Drought differently affects growth properties, leaf ultrastructure, nitrogen absorption and metabolism of two dominant species of *Hippophae* in tibet plateau, **Acta physiologiae plantarum**, v. 41, 2019.

CIOMPI, S. *et al.* The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower, **Plant Science**, v. 118, p. 177-184, 1996.

CLAY, D.E., TROOIEN, T.P. Understanding soil water and yield variability in precision farming. **Practical Mathematics for Precision Farming**, p. 136–147, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2134/practicalmath2016.0025>.

COSTA, D.; DANTAS, J. Efeito do substrato na germinação de sementes de amaranto (*Amaranthus* spp). **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, 2008.

DI FERDINANDO, M. *et al.* Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable mediterranean areas, **Environmental and Experimental Botany** v. 103, p. 107-116, 2014.

EVANS, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants, **Oecologia** v. 78, p. 9-19, 1989.

FAHAD, S. *et al.* Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. **Frontiers in Plant Science**, v.8, 2017.
DOI:10.3389/fpls.2017.01147

FERRERES, F. *et al.* Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class iii peroxidase: an h₂o₂ affair? **Journal of Experimental Botany** v. 62, p. 2841-2854, 2011.

FINI, A. *et al.* Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants, **Plant Signaling & Behavior** v. 6, p. 709-711, 2011.

GASTAL, F.; NELSON, C. J. Nitrogen use within the growing leaf blade of tall fescue, **Plant physiology**, v. 105, p. 191-197, 1994.

GANDIA-HERRERO, F. *et al.* Biological Activities of Plant Pigments Betalains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.56, n.6, p. 937-945, 2016.

GRASSI, G. *et al.* Photosynthetic parameters in seedlings of *Eucalyptus grandis* as affected by rate of nitrogen supply, **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 1677-1688, 2002.

GUHA, A. *et al.* Non-enzymatic antioxidative defence in drought-stressed mulberry (*Morus indica* L.) genotypes, **Trees** v. 26, p. 903-918, 2012.

HAK, R. *et al.* Chlorophyll a fluorescence signatures of nitrogen deficient barley leaves. **Photosynthetica** v.28, p. 151-159, 1993.

HARPER, J.E. **Nitrogen Metabolism**. In Physiology and Determination of Crop Yield (eds K.J. Boote, J.M. Bennett, T.R. Sinclair and G.M. Paulsen). 1994. DOI: <https://doi.org/10.2134/1994.physiologyanddetermination.c19>

HEWITT, E. **Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition**. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1966.

HUANG, L. *et al.* Uptake and metabolism of ammonium and nitrate in response to drought stress in *Malus prunifolia*, **Plant Physiology and Biochemistry** v. 127, p. 185-193, 2018.

KARABOURNIOTIS, G. et al. "Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence": two dilemmas with soluble phenolics as a joker, **Plant Science** v. 227, p. 21-27, 2014.

KARIMI, S. et al. Drought effects on growth, water content and osmoprotectants in four olive cultivars with different drought tolerance, **International Journal of Fruit Science**, v. 18, p. 254-267, 2018.

KISHOR, P. B.; SREENIVASULU, N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? **Plant, Cell & Environment** v. 37, p. 300-311, 2014.

KUMAR, R. et al. An inside review of *Amaranthus spinosus* Linn: a potential medicinal plant of India. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 643-653, 2014.

LAMPTEY, S. et al. Photosynthetic response of maize to nitrogen fertilization in the semiarid western loess plateau of China, **Crop Science** v. 57, p. 2739-2752, 2017.

LASA, B. et al. The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation, **Scientia Horticulturae** v. 91, p. 143-152, 2001.

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

LI, J. et al. Effects of drought stress on the metabolic properties of active oxygen species, nitrogen and photosynthesis in cucumber 'jinchun no. 5' seedlings, **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 48, p. 175-181, 2014.

LICHTENTHALER, H. K. **Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes**. Plant Cell Membranes, v. 148, p. 350–382, 1987.

MA, J. et al. Analysis of chlorophyll a fluorescence and proteomic differences of rice leaves in response to photooxidation, **Acta physiologiae plantarum** v. 39, p. 46, 2017.

MAKINO, Y.; UENO, O. Structural and physiological responses of the C4 grass *Sorghum bicolor* to nitrogen limitation. **Plant Production Science**, v. 21, p. 39 - 50, 2018.

MALAVOLTA, E; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas. **Princípios e aplicações**. 2ª ed. Piracicaba: POTAFOS, p. 319, 1997.

M'HAMDI M. et al. Effect of genotype and growing season on nitrate accumulation and expression patterns of nitrate transporter genes in potato (*Solanum tuberosum* L.), **Archives of Agronomy and Soil Science** v. 62, p. 1508-1520, 2016.

MITTLER, R. Abiotic Stress, the Field Environment and Stress Combination. **Trends in plant science**, v. 11, p. 9-15, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>

MYERS, R. L. Amaranth: New crop opportunity. In: JANICK, J., ed. **Progress in new crops**, Alexandria, ASHS Press, p. 207-220, 1996.

MYERS, R. L. Nitrogen fertilizer effect on grain amaranth. **Agronomy Journal**, Madison, v. 90, n. 5, p. 597-602, Sep./Oct. 1998.

NCUBE, B.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 82, p. 11–20, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.05.009>

NEUGART *et al.*, Food and Security Nutrition, **Elsevier Science**, p. 140 – 143, 2017.

PACHAURI, K. *et al.* **Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Ipcc, 2014.

PAWAR, V. V *et al.* Effect of osmotic stress on osmolyte accumulation and ammonia assimilating enzymes in chickpea cultivars, **Indian Journal of Plant Physiology** v. 20, p. 276-280, 2015.

POORTER, H. *et al.* Causas e consequências da variação na massa foliar por área (LMA): uma meta-análise. **New Phytologist**, v. 182, p. 565-588. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x>

RASTOGI, A., & SHUKLA, S. Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 109–125, 2013. doi:10.1080/10408398.2010.517876

RAZGALLAH, N. *et al.* Nitrate contents in some vegetables in tunisia, **Archives of Agronomy and Soil Science** v. 62, p. 473-483, 2016.

RIVERO, J. L. L. **Genética y mejoramiento de cultivos alto andinos** La Paz: Instituto Nacional del Desarrollo Experimental, p. 457, 1994.

RUFTTY JR, T. W.; MACKOWN, C. T.; VOLK, R. J. Alterations in nitrogen assimilation and partitioning in nitrogen stressed plants, **Physiologia plantarum**, v. 79, p. 85-95, 1990.

SALACHAS, G. *et al.* Impact of Nitrogen Deficiency on Biomass Production, Leaf Gas Exchange, and Betacyanin and Total Phenol Concentrations in Red Beet (*Beta vulgaris* L. ssp *vulgaris*) Plants. **European Journal of Horticultural Science** v. 76, p. 194-200, 2011.

SAREER, Ovais *et al.* Genetic, developmental and temporal variability in nitrate accumulation and nitrate reductase activity in medicinal herb *Andrographis paniculata*. **Pedosphere**, v. 26, n. 6, p. 839-847, 2016.

SARKER, U.; OBA, S. Drought stress effects on growth, ros markers, compatible solutes, phenolics, flavonoids, and antioxidant activity in *Amaranthus tricolor*, **Applied biochemistry and biotechnology** v. 186, p. 999-1016, 2018.

SAUER, J. D. (1950). The grain amaranths: A survey of their history and classification. **Ann Missouri Bot Gard**. 37: 561–632.

SEEPAL, R., GEORGE, S., & WRIGHT, D. L. Comparative response of *Brassica carinata* and *B. napus* vegetative growth, development and photosynthesis to nitrogen nutrition. **Industrial Crops and Products**, 94, 872–883, 2016. DOI: doi:10.1016/j.indcrop.2016.09.054

SENAD, M. *et al.* Response of cherry tomato seedlings to liquid fertiliser application under water stress, **Horticultural Science**, v. 45, p. 22-28, 2018.

SHAHROKHANIA, M. H.; SEPASKHAH, A. R. Physiologic and agronomic traits in saower under various irrigation strategies, planting methods and nitrogen fertilization. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 126-139, 2017.

SLABBERT, M.; KRUGER, G. Antioxidant enzyme activity, proline accumulation, leaf area and cell membrane stability in water stressed *Amaranthus* leaves, **South African Journal of Botany** v. 95, p. 123-128, 2014.

SICHER, R. *et al.* Water-deficiency effects on single leaf gas exchange and on C4 pathway enzymes of maize genotypes with differing abiotic stress tolerance, **Photosynthetica** v. 53, p. 3-10, 2015.

SITOMPUL, S.; ZULFATI, A. Betacyanin and Growth of Beetroot (*Beta vulgaris* L.) in Response to Nitrogen Fertilization in a Tropical Condition. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**, v. 41, 2019. DOI: 10.17503/agrivita.v41i1.2050.

SONG, J.; *et al.* The influence of nitrogen availability on anatomical and physiological responses of *Populus alba* X *P. glandulosa* to drought stress, **BMC Plant biology** v. 19, p. 63, 2019.

SONG, Y. *et al.* Nitrogen increases drought tolerance in maize seedlings, **Functional Plant Biology**, v. 46, p. 350-359, 2019.

SPEHAR, C. R. Breeding soybeans to the low latitudes of Brazilian Cerrados (Savannahs). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 8, p. 1167-1180, 1994.

SPEHAR, C. R.; SANTOS, R. L. B.; SOUZA, P. I. M. Novas espécies de plantas de cobertura para o plantio direto. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DO SISTEMA PLANTIO DIRETO. **Anais: Embrapa- CNPT**, Passo Fundo, v. 2, p. 169-172, 1997.

SPEHAR, C. R. Production systems in the savannas of Brazil: key factors to sustainability. In: LAL, R. (Ed.). **Soil quality and agricultural sustainability**. Chelsea: Ann Arbor Press, p. 301-318, 1998.

SPEHAR, C. R.; LARA CABEZAS, W. A. R. Introdução e seleção de espécies para a diversificação do sistema produtivo nos cerrados. In: LARA CABEZAS, W. A. R.; FREITAS, P. L. (Ed.). **Plantio direto na integração lavoura pecuária**. Uberlândia: UFU, p. 179-188, 2001.

SPEHAR, Carlos Roberto *et al.* Amaranto BRS Alegria: alternativa para diversificar os sistemas de produção. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 659-663, 2003.

STAGNARI, F. *et al.* Water stress effects on growth, yield and quality traits of red beet, **Scientia Horticulturae** v. 165, p. 13-22, 2014.

STINTZING, F.; CARLE, R. Betalains-emerging prospects for food scientists. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 1, p. 514-525, 2007.

SUMBELE, S. *et al.* Photosynthetic capacity is negatively correlated with the concentration of leaf phenolic compounds across a range of different species, **AoB Plants**, 2012.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAZOE, Y.; NOGUCHI, K; TERASHIMA, I. Effects of growth light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in leaves of a C4 plant, *Amaranthus cruentus*, **Plant, Cell & Environment** v. 29, p. 691-700, 2006.

TEIXEIRA, L.; SPEHAR, C.; COPATI, S. Caracterização agronômica de amaranto para cultivo na entressafra no Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000100006>

TORELLO, W.A.; RICE, L. A. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive tolerant turfgrass. **Plant Soil**, v. 93, p. 241-247, 1986.
WANG, Q. *et al.* High-efficient utilization and uptake of n contribute to higher nue of 'qinguan' apple under drought and n-deficient conditions compared with 'honeycrisp', **Tree physiology**, 2019.

WANG, X.; WANG, L.; SHANGGUAN, Z. Leaf gas exchange and fluorescence of two winter wheat varieties in response to drought stress and nitrogen supply, **PLoS One** v. 11, 2016.

WANG, Y. *et al.* Growth, secondary metabolites and enzyme activity responses of two edible fern species to drought stress and rehydration in northeast China, **Agronomy**, v. 9, 2019.

XIONG, X. *et al.* Alleviation of drought stress by nitrogen application in *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* L., **Agronomy**, v.8, p. 66, 2018.

ZHANG, R. *et al.* Photosynthetic performance of maize hybrids to drought stress, **Russian Journal of Plant Physiology** v. 62, p. 788-796, 2015.

ZHONG, C. *et al.* Nitrogen metabolism in adaptation of photosynthesis to water stress in rice grown under different nitrogen levels, **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1079, 2017.

ZUBILLAGA, M. F. *et al.* Response of *Amaranthus cruentus* cv mexicano to nitrogen fertilization under irrigation in the temperate, semiarid climate of north patagonia, argentina, **Journal of plant nutrition** , v. 42, p. 99-110, 2019.