

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÃO ENTRE SILÍCIO E CITOCININAS NAS
RESPOSTAS DO TOMATEIRO À TOXICIDADE DE AMÔNIO**

Rafael Ferreira Barreto

Engenheiro Agrônomo

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INTERAÇÃO ENTRE SILÍCIO E CITOCININAS NAS
RESPOSTAS DO TOMATEIRO À TOXICIDADE DE AMÔNIO**

Rafael Ferreira Barreto

Orientador: Prof. Dr. Renato de Mello Prado

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

B273i

Barreto, Rafael Ferreira

Interação entre silício e citocininas nas respostas do
tomateiro à toxicidade de amônio / Rafael Ferreira Barreto. --
Jaboticabal, 2019

58 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Renato de Mello Prado

Coorientador: Rogério Falleiros Carvalho

1. Engenharia agrônômica. 2. Fisiologia vegetal. 3. Plantas
Efeito do nitrogênio. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INTERAÇÃO ENTRE SILÍCIO E CITOCININAS NAS RESPOSTAS DO TOMATEIRO À TOXICIDADE DE AMÔNIO

AUTOR: RAFAEL FERREIRA BARRETO

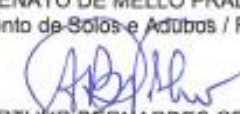
ORIENTADOR: RENATO DE MELLO PRADO

COORDENADOR: ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



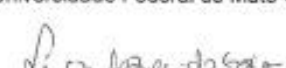
Prof. Dr. RENATO DE MELLO PRADO
Departamento de Solos e Adubos / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ARTHUR BERNARDES CECILIO FILHO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. CID NAUDI SILVA CAMPOS
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS / Chapadão do Sul/MS



Prof. Dr. LUCAS APARECIDO GAION
UNIMAR / Marília/SP



Dra. LÚCIA ELLEN PINO
Agrônoma Autônoma / Piracicaba/SP

Jaboticabal, 07 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL FERREIRA BARRETO – nascido em Aparecida do Taboado, Mato Grosso do Sul, aos 11 dias do mês de julho de 1991, filho de Cleuza Maria Ferreira e Osmar Barreto Neto. Graduado em Engenharia Agrônômica, pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, Câmpus de Cassilândia (2013). No ano de 2014, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Câmpus de Chapadão do Sul. Durante o Mestrado, realizou duas missões de estudos pelo Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD/CAPES) junto à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e obteve o título de Mestre em Agronomia pela UFMS, no ano de 2016. Nesse mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Câmpus de Jaboticabal. Durante o doutorado, foi autor/coautor de artigos científicos, capítulos de livro, membro de bancas de defesa de trabalhos de conclusão de curso e coorientou trabalhos de conclusão de curso de agronomia. Realizou Doutorado Sanduíche no “Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas - Universitat Politècnica de València”, Espanha. Realizou dois estágios em docência na disciplina de Nutrição de Plantas. É membro do Grupo de Estudos em Nutrição de Plantas da Unesp (GENPLANT), do Laboratório de Fisiologia Vegetal e da pesquisa Trop-T/FACE, sobre mudanças climáticas na agricultura, na USP de Ribeirão Preto-SP.

Aos meus pais Osmar e Cleuza, por todo apoio, orações, incentivos, ensinamentos, esforço e trabalho que tornam minha vida mais tranquila.

À minha avó Anizia, pelos cuidados e orações.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio.

Ofereço e dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por guiar meus passos e pela força concedida para lutar por meus objetivos.

Ao meu orientador do mestrado, Prof. Dr. Aguinaldo José Freitas Leal, por me incentivar a vir para Jaboticabal pelo Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD/CAPES).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato de Mello Prado, pelas várias oportunidades dadas no decorrer do curso, pela confiança, pelos conselhos e ensinamentos. Agradeço pela excelente orientação e pelas conversas, que foram motivacionais e inspiradoras.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho, pela confiança, pelas oportunidades, conversas, estrutura cedida para o desenvolvimento dos experimentos e tempo dedicado a minha coorientação. De modo informal, fui privilegiado em ter dois orientadores.

À FCAV/UNESP e ao programa de pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela oportunidade de cursar o doutorado e pela estrutura disponibilizada. A todos os docentes e funcionários que contribuíram com a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Às técnicas de laboratório, Cláudia e Sonia, pela indispensável ajuda nas avaliações dos experimentos e pela amizade.

À Dra. Isabel López-Díaz, Dra. Esther Carrera e ao técnico de laboratório Jorch Bapa, do “Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas”, pela orientação na Espanha.

Aos amigos de moradia: Guilherme, Leonardo, Gabriel e Maurício, que foram minha família em Jaboticabal.

Aos amigos do GENPLANT: Cid, Luiz Cláudio (Mancha), Gabriel, Cláudio, Thaís, Guilherme, Flávio, Jonas, Marcilene, Gelza, Camila, Marcia, Victor, Antônio Márcio, Antônio Buchelt, Alexander, Dilier, Edilaine, Jonh, Joaquim e Jonilson, pela convivência, ajuda e experiências compartilhadas.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Joel, Lucas, Reginaldo, Victor, Clebson, Carol, Mirela, Gilmar, Cássia, Emilaine, Mayara, Denise, Letícia, Domindos, Kevein, Clara, Noelle e Ricardo, pela convivência, ajuda e experiências compartilhadas.

Aos amigos Tiago Rodrigues, Jean Silva, Eric Seraguzi, Alexandre Vendrame, Gabriela Andreatti, Polliana Parise, Viviane Viveiros, Marcus Vinícius, Sebastião Filho, Estefânia Bardivieso, Hérík Pelizaro, Robson Medeiros e a todos os colegas, pelo incentivo e bons momentos vividos.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Cultivo de plantas em solução nutritiva.....	2
2.2 Estratégias de manejo do Si na solução nutritiva.....	4
2.3 Amônio na nutrição de plantas.....	5
2.4 Citocininas e suas interações com o NH_4^+ e com o Si	7
2.5 Uso de ferramenta genética para estudar as CKs	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Experimento para identificar a concentração tóxica de NH_4^+	9
3.1.1 Avaliações	9
3.2 Experimento com proporção tóxica de NO_3^- e NH_4^+ , e concentrações de Si na forma de silicato de potássio ou ácido silícico estabilizado.....	11
3.2.1 Avaliações	12
3.3 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de Si.....	13
3.3.1 Avaliações	13
3.4 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e Si no tomateiro MT e no <i>MT CKX2</i>	14
3.4.1 MT	14
3.4.1 Avaliações	15
3.4.2 <i>MT CKX2</i>	17
3.5 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de BA associadas ao NH_4^+	18
3.5.1 Avaliações	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Experimento para identificar a concentração tóxica de NH_4^+	19
4.1.1 Teor e acúmulo de N na parte aérea, índice de cor verde e índice de vazamento de eletrólitos	19
4.1.2 Área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes.....	19
4.2 Experimento com proporção tóxica de NO_3^- e NH_4^+ , e concentrações de Si na forma de silicato de potássio ou ácido silícico estabilizado.....	22
4.3 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de Si.....	25
4.3.1 Teor e acúmulo de N	25
4.3.2 Teor e acúmulo de Si.....	25

4.3.3	Clorofila, carotenoides e índice de vazamento de eletrólitos na parte aérea e nas raízes	26
4.3.4	Altura de plantas, área foliar e massa seca da parte aérea e das raízes	27
4.3.5	Plantas cultivadas em NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de Si	29
4.4	Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e Si no tomateiro MT e no <i>MT CKX2</i>	30
4.4.1	Teor e acúmulo de Si no MT	30
4.4.2	Teor e acúmulo de N no MT e no <i>MT CKX2</i>	31
4.4.3	Clorofila total e carotenoides no MT e no <i>MT CKX2</i>	32
4.4.4	Malondialdeído e H_2O_2 no MT e no <i>MT CKX2</i>	33
4.4.1	Altura de plantas, área foliar, massa seca da parte aérea e da raiz no MT e no <i>MT CKX2</i>	34
4.4.2	Plantas de MT e de <i>MT CKX2</i>	36
4.4.3	Quantificação de CKs no MT	37
4.5	Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de BA associadas ao NH_4^+	38
5	CONCLUSÕES	41
6	REFERÊNCIAS	41

INTERAÇÃO ENTRE SILÍCIO E CITOCININAS NAS RESPOSTAS DO TOMATEIRO À TOXICIDADE DE AMÔNIO

RESUMO – Uma consequência da toxicidade de amônio (NH_4^+) é a diminuição do conteúdo de citocininas (CKs). Dessa forma, o fornecimento de CK, na forma de *trans*-zeatina (*tZ*), pode aliviar a toxicidade de NH_4^+ , e a CK sintética 6-benziladenina (BA), de menor custo, ainda não foi estudada quanto ao seu efeito sobre a toxicidade de NH_4^+ . Além disso, o silício (Si), que é um elemento benéfico, é capaz de amenizar vários estresses, como a toxicidade de NH_4^+ . Objetivou-se verificar se o alívio da toxicidade de NH_4^+ com o uso do Si é dependente do aumento do teor de CKs no tomateiro cv Micro-Tom (MT), os efeitos do Si no tomateiro transgênico *MT CKX2* (baixo teor de CKs) submetido à toxicidade de NH_4^+ e se o regulador de crescimento BA alivia a toxicidade de NH_4^+ no tomateiro MT. Para isso, realizaram-se cinco experimentos em tomateiro, com a aplicação dos tratamentos na solução nutritiva. No experimento com concentrações de NH_4^+ entre 1,25 e 7,5 mmol L⁻¹, 5,9 mmol L⁻¹ provocou a toxicidade de NH_4^+ , com diminuição de 10% na massa seca da parte aérea. No experimento com concentrações de Si entre 0,2 e 0,8 mmol L⁻¹, na forma de silicato de potássio (SiK) ou ácido silícico estabilizado (ASiE), a toxicidade de NH_4^+ não foi aliviada. No experimento com concentrações de Si entre 1,0 e 2,5 mmol L⁻¹, na forma de SiK, a concentração de 1,29 mmol L⁻¹ de Si aliviou a toxicidade de NH_4^+ . No experimento com N nas formas de NO_3^- ou NH_4^+ (5,9 mmol L⁻¹), na ausência e na presença de Si (1,29 mmol L⁻¹) no tomateiro MT, o Si resultou na diminuição do conteúdo de CKs na raiz e aumento na parte aérea, independentemente da forma de N. No mesmo experimento com o tomateiro *MT CKX2*, o Si não aliviou a toxicidade de NH_4^+ . No experimento com N (5,9 mmol L⁻¹) nas formas de NO_3^- ou NH_4^+ , e NH_4^+ associado às concentrações de BA entre 10e^{-10} e 10e^{-6} mol L⁻¹, 10e^{-9} mol L⁻¹ resultou em maior crescimento das raízes e não houve efeito na parte aérea. Em conclusão, o alívio da toxicidade de NH_4^+ com uso do Si foi dependente do aumento do conteúdo da *tZ* na parte aérea, mas não da isopenteniladenina (iP). Com a deficiência de CKs, o Si não alivia a toxicidade de NH_4^+ , e a BA não alivia a toxicidade de NH_4^+ na parte aérea do tomateiro MT.

Palavras-chave: ácido silícico, nitrogênio, Micro-Tom, regulador de crescimento, solução nutritiva.

INTERACTION BETWEEN SILICON AND CYTOKININS IN TOMATO RESPONSES TO AMMONIUM TOXICITY

ABSTRACT – A consequence of ammonium (NH_4^+) toxicity is the decrease in cytokinins (CKs) content. However, the supply of CK in the nutrient solution, in *trans*-zeatin (*tZ*) form, can alleviate NH_4^+ toxicity, and CK synthetic 6-benzyladenine (BA), with lower cost, has not yet been studied on the NH_4^+ toxicity. Similarly, silicon (Si), which is a beneficial element known to relieve stresses, also alleviates NH_4^+ toxicity. The objective was to verify if the relief of NH_4^+ toxicity by Si is dependent on the increase of the CKs content in tomato cv Micro-Tom (MT), the effects of Si on the transgenic tomato *MT CKX2* (CKs deficient) submitted to NH_4^+ toxicity, and if the growth regulator 6-benzyladenine (BA) alleviates NH_4^+ toxicity in tomato MT. For this, five experiments were carried in tomato, with treatments application in nutrient solution. In experiment with NH_4^+ concentrations between 1.25 and 7.5 mmol L^{-1} , 5.9 mmol L^{-1} caused NH_4^+ toxicity, with shoot dry weight 10% decrease. In experiment with Si concentrations between 0.2 and 0.8 mmol L^{-1} , via potassium silicate (SiK) or stabilized silicic acid (ASiE), NH_4^+ toxicity was not alleviated. In the experiment with Si concentrations between 1 and 2.5 mmol L^{-1} , via SiK, the concentration of 1.29 mmol L^{-1} alleviated NH_4^+ toxicity. In experiment with N in NO_3^- or NH_4^+ forms (5.9 mmol L^{-1}), in absence and presence of Si (1.29 mmol L^{-1}) in MT tomato, Si decreased CKs content in root and increase in shoot, independent of the N form. In same experiment, but with tomato *MT CKX2*, Si did not alleviate NH_4^+ toxicity. In experiment with N (5.9 mmol L^{-1}) in NO_3^- or NH_4^+ forms, and NH_4^+ associated with BA concentrations between 10e^{-10} and $10\text{e}^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $10\text{e}^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ resulted in higher root growth and there was no effect in shoot. In conclusion, the relief of NH_4^+ toxicity with Si was dependent on the increase of CK *trans*-zeatin (*tZ*) in shoot, but not isopentenyladenine (iP). With deficiency of CKs, Si do not alleviate NH_4^+ toxicity, and the synthetic CK BA do not alleviate NH_4^+ toxicity in MT shoot.

Keywords: growth regulator, Micro-Tom, nitrogen, nutrient solution, silicic acid

1 INTRODUÇÃO

A agricultura requer o uso intensivo de fertilizantes nitrogenados, que são absorvidos pelas plantas principalmente nas formas de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), mas esta última pode ser tóxica (Britto e Kronzucker, 2002).

Evitar a toxicidade de NH_4^+ , assim como de qualquer outra substância, parece ser simples, como não utilizá-la, ou identificar a concentração que não provoque essa desordem nutricional. No entanto, em ecossistemas naturais e agrícolas com baixa temperatura, solos ácidos e em condições de hipóxia, o NH_4^+ é a forma predominante de nitrogênio (N), em concentrações que podem ser até três vezes maiores que as de NO_3^- (Miller et al., 2007).

Além disso, alguns fatores podem fazer a mesma concentração de NH_4^+ na solução nutritiva passar a ser tóxica aos cultivos, como o aumento da temperatura do ar (Liu et al., 2017) e a baixa concentração de K^+ na solução nutritiva (Balkos et al., 2010), que favorecem a maior absorção NH_4^+ , e períodos nublados, onde a taxa fotossintética diminui (Ariz et al., 2011).

Em contrapartida, existe um potencial benefício da utilização do NH_4^+ , que é o menor gasto de energia da planta por dispensar as etapas de redução assimilatória do N (Salsac et al., 1987). Dessa forma, os fatores-alvos das pesquisas para evitar a toxicidade de NH_4^+ têm sido a irradiação luminosa, CO_2 , K^+ , NO_3^- , temperatura do ar, hormônios (Bittsánszky et al., 2015) e o silício (Si) (Barreto et al., 2016).

Com relação aos hormônios, uma consequência do NH_4^+ é a diminuição do conteúdo de CKs, pois sua biossíntese foi estimulada pelo NO_3^- , mas não pelo NH_4^+ (Walch-Liu et al., 2000). Assim, o fornecimento de CK no meio de cultivo, na forma de *trans*-zeatina (*tZ*), pode aliviar a toxicidade de NH_4^+ , conforme demonstrado em *Arabidopsis thaliana* (Shtratnikova et al., 2015), e a CK sintética 6-benziladenina (BA), de menor custo, ainda não foi estudada quanto ao seu efeito sobre a toxicidade de NH_4^+ .

Além disso, o uso de substâncias que possam estimular a biossíntese de CKs pode ser ferramenta interessante para mitigar a toxicidade de NH_4^+ . Por exemplo, o Si é um elemento benéfico conhecido por aliviar estresses, como a toxicidade de NH_4^+ (Gao et al., 2014; Barreto et al., 2016). De fato, existe evidência de que o Si atue no

aumento da biossíntese de CKs, verificado em plantas de *A. thaliana* e de *Sorghum bicolor* (Markovich et al., 2017).

Com base no exposto, foi hipotetizado que o Si atenua a toxicidade de NH_4^+ , de modo dependente das CKs, no cultivar miniatura de tomateiro Micro-Tom (MT). Para verificar essa hipótese, além da quantificação de CKs no MT, pode ser utilizado o transgênico *MT CKX2*, com baixo teor de CKs (Pino-Nunes, 2009). Assim, espera-se que o Si não alivie a toxicidade de NH_4^+ nesse transgênico.

Objetivou-se verificar se o alívio da toxicidade de NH_4^+ com o uso do Si é dependente do aumento do teor de CKs no tomateiro MT, os efeitos do Si no tomateiro transgênico *MT CKX2* submetido à toxicidade de NH_4^+ e se o regulador de crescimento BA alivia a toxicidade de NH_4^+ no tomateiro MT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo de plantas em solução nutritiva

A hidroponia é uma importante ferramenta para estudos em nutrição de plantas. Este sistema possibilita a realização de pesquisas com a omissão de nutrientes e o estudo de suas formas químicas, concentrações, proporções e interações, e permite a compreensão de seus efeitos de forma isolada ou em combinação (Prado et al., 2017).

Após 25 anos de pesquisas, o sistema NFT - “Nutrient Film Technique”, que consiste na circulação de uma fina camada de solução nutritiva em canais com declividade para fornecer água e nutrientes às plantas, que foi desenvolvido por Allen Cooper na década de 60, com primeiros relatos de sucesso para o tomateiro (Cooper, 1974), foi o sistema responsável pela difusão do cultivo hidropônico em escala comercial.

Para as pesquisas na área de nutrição de plantas, em que, na maioria dos casos, a composição da solução nutritiva é alterada de acordo com os tratamentos, o sistema mais utilizado é o “floating”, que consiste em tanques (15 a 20 cm de altura) onde se mantém a lâmina de solução nutritiva próxima ao limite do tanque,

comumente aerada com a injeção de ar, as raízes ficam submersas, e a parte aérea flutua sobre a superfície líquida em placas de isopor (poliestireno) (Martínez, 2016).

Além disso, quando se trata de experimentação em nutrição de plantas, é comum a utilização de modificações da solução recomendada por Hoagland e Arnon (1950). Isso porque essa solução é a base para as pesquisas e para se estudar formulações mais ajustadas para cada espécie, condições de cultivo e estágio de desenvolvimento, ou seja, as soluções nutritivas comerciais disponíveis no mundo.

Em escala comercial, a forma mais comum de se manejar a solução nutritiva é com o monitoramento de sua condutividade elétrica, por ser de aplicação prática ao técnico responsável e porque o uso de leitores individuais de íons não é difundido entre os produtores hidropônicos (Bamsey et al., 2014). Assim, o volume do reservatório é ajustado com água, e a solução nutritiva se dilui até determinado valor crítico, de acordo com cada cultura, e, então, o ajuste do volume é feito com solução nutritiva.

Porém, essa prática não costuma ser aplicada em experimentos na área de nutrição porque as concentrações iniciais dos nutrientes são alteradas ao longo do cultivo, devido às diferenças da exigência nutricional em função dos estádios de desenvolvimento (Prado et al., 2011). Portanto, nos experimentos, a solução nutritiva é renovada, ou seja, restaurada a concentração inicial, normalmente entre 4 e 7 dias, a critério do pesquisador e do estágio de desenvolvimento da planta (Horchani et al., 2011).

Em soluções nutritivas para experimentos, quando se trabalha com concentrações de determinado nutriente, junto com a fonte deste vai o íon acompanhante, sendo difícil ou até mesmo impossível equilibrar todos os nutrientes. Assim, é importante certificar-se de que os íons acompanhantes das fontes utilizadas não terão influência sobre o objeto de estudo. Por exemplo, quando o tomateiro foi induzido à toxicidade de NH_4^+ (15 mmol L^{-1}) com as fontes cloreto de amônio ou sulfato de amônio, não houve influência dos íons acompanhantes de Cl^- e SO_4^{2-} (Barreto et al., 2018).

Em escala comercial, a água utilizada no preparo da solução nutritiva pode conter elementos químicos, até certos limites, e os fertilizantes devem ser de alta solubilidade em água (Trejo-Téllez e Gómez-Merino, 2012). No entanto, em

experimentos, dependendo do objetivo, é necessário utilizar água deionizada e sais com alta solubilidade e de alta pureza, como, por exemplo, para demonstrar que o Si pode ser benéfico ao tomateiro (Miyake e Takahashi, 1978).

2.2 Estratégias de manejo do Si na solução nutritiva

O Si é comumente acumulado nos tecidos vegetais, uma vez que os ambientes de cultivo contêm esse elemento benéfico na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4), que é a forma absorvida pelas plantas, em teores na solução do solo que variam de 0,1 a 0,6 mM (Epstein, 1999), e nos rios por volta de 0,15 mM (Tréguer et al., 1995).

Assim, existe a indicação de que as plantas em hidroponia possam acumular menos Si, em relação aos cultivos no solo com elevado teor desse elemento (Epstein, 1999). Por isso, é proposto o enriquecimento da solução nutritiva com Si, utilizando-se de fontes solúveis, como o silicato de potássio (2 mmol L^{-1}) (Prado et al., 2018).

No entanto, a quantidade de Si prontamente disponível às plantas (H_4SiO_4) depende de vários fatores, como a concentração, a composição da solução nutritiva e o tempo após o preparo. Por exemplo, quanto maior a concentração de H_4SiO_4 , maior sua polimerização (McKeague e Cline, 1963). A taxa de diminuição da concentração de H_4SiO_4 em soluções com Na^+ , K^+ ou NH_4^+ é maior até próximo de 100 minutos, e depois tende a diminuir (Harrison e Loton, 1995). No entanto, isso pode ser agravado em soluções com altas concentrações de cátions bivalentes pela formação de silicatos de baixa solubilidade (Santschi e Schindler, 1974).

Na tentativa de minimizar esses problemas, duas estratégias estão sendo pesquisadas. Primeiro, o desenvolvimento de novas fontes com Si na forma de H_4SiO_4 , a partir da acidificação (HCl ou H_3PO_4) de silicatos solúveis (silicato de potássio ou de sódio) e da adição de aditivos estabilizantes, que conferem à fonte valores pH entre 0,4 a 4, sendo a fonte chamada de ácido silícico estabilizado (Prado et al., 2017), tendo como hipótese ser equivalente ou mais eficiente que os silicatos comuns em menores concentrações (Crusciol et al., 2013), e segundo, a utilização dos cátions bivalentes na forma de quelato na solução nutritiva.

A ordem de adição do Si no preparo da solução nutritiva também pode diminuir sua disponibilidade. Para evitar esse problema, recomenda-se adicionar a fonte de Si na água, ajustar o valor pH para 5,8 ($\pm 0,2$), e só então adicionar os demais elementos.

O preparo de duas soluções, duas vezes mais concentradas, uma com os nutrientes (até 100% da recomendação de Hoagland e Arnon, 1950) e a outra apenas com o Si, ambas com o valor pH ajustado e posterior mistura, também parece não apresentar problemas quanto à polimerização do Si (Prado et al., 2017).

Tomados esses cuidados, as chances de sucesso com o fornecimento de Si são maiores, e seu acúmulo nos tecidos vegetais é importante porque, mesmo não sendo nutriente, atua de forma benéfica em condições de estresses, como, por exemplo, a toxicidade de NH_4^+ , por estimular a maior atividade de enzimas antioxidantes, por aumentar a integridade física das membranas e por aumentar a taxa fotossintética e a eficiência de uso da água (Gao et al., 2014; Barreto et al., 2017).

2.3 Amônio na nutrição de plantas

O N disponível às plantas encontra-se principalmente nas formas de NO_3^- e de NH_4^+ . Para ser incorporado em compostos orgânicos, o N precisa estar na forma de NH_4^+ . Quando o NO_3^- é absorvido, é necessário que ocorra sua redução assimilatória, sendo um dos processos de maior consumo de energia das plantas (Salsac et al., 1987).

O menor gasto de energia metabólica com a nutrição amoniacal pode ser convertido em maior produção de matéria seca, pois uma proporção adequada de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ proporciona maior crescimento na maioria das espécies vegetais, em comparação ao N fornecido em uma única forma (Britto e Kronzucker, 2002). No entanto, o NH_4^+ pode ser tóxico, com primeiros relatos há 137 anos (Darwin, 1882) e permanece atual (Esteban et al., 2016). Os sintomas desta desordem nutricional no tomateiro MT, com 15 mmol L^{-1} , foram a menor área foliar, folhas curvadas para baixo, com clorose e necrose das bordas das folhas velhas. Nas raízes, ocorre o menor crescimento, a cor fica menos clara em relação às plantas com NO_3^- e têm-se pontos necróticos (Barreto et al., 2018).

Esses sintomas acontecem porque a concentração de NH_4^+ nas células é regulada por um mecanismo de fosforilação dos transportadores. Ou seja, a absorção ativa é interrompida assim que a quantidade ótima é atingida. No entanto, quando ocorre aumento rápido da concentração de NH_4^+ nas células, que pode acontecer em função da exposição das raízes a altas concentrações de NH_4^+ , ou das condições

ambientais, a fosforilação do transportador pode não ser suficientemente rápida para evitar teores excessivos de NH_4^+ (Lanquar e Frommer, 2010). Além disso, o NH_4^+ pode ser absorvido através das aquaporinas, transportadores de cátions não seletivos e transportadores de K^+ , o que aumenta o risco de concentrações em excesso (Bittsánszky et al., 2015).

Quando a quantidade de NH_4^+ absorvida e produzida na fotorrespiração é maior que seu consumo, o NH_4^+ reage com o OH^- do citoplasma, é formada a NH_3 , que é permeável à membrana, e, no vacúolo, a NH_3 reage com o H^+ e forma NH_4^+ . Ou seja, o gradiente de pH necessário ao transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração é alterado pelo NH_4^+ em excesso (Britto e Kronzucker, 2002). Nessas condições, tem-se aumento do teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e degradação dos cloroplastos (Baohai et al., 2014).

Além de afetar a fotossíntese e a respiração, o NH_4^+ em excesso resulta no menor acúmulo de K, Ca e Mg, verificado em plantas de tomateiro MT (Barreto et al., 2018), no alto custo energético para manter baixo o teor de NH_4^+ na célula, e pode resultar no desbalanço hormonal (Esteban et al., 2016). Por exemplo, foi demonstrado em plantas de tabaco que o fornecimento de N na forma amoniacal inibe a biossíntese de CKs (Walch-Liu et al., 2000).

Nesse contexto, o tomateiro é considerado uma espécie sensível ao NH_4^+ (Horchani et al., 2011). Dessa forma, nos trabalhos, o crescimento ou a produção do tomateiro com N- NH_4^+ por volta de 20% do N total não teve diferença de 100% com NO_3^- , e quando o NH_4^+ foi fornecido em maiores concentrações, ou na mesma concentração que o NO_3^- , provocou toxicidade (Borgognone et al., 2013; Barreto et al., 2018).

Além disso, tem-se o aumento da ocorrência da podridão apical nos frutos do tomateiro, que é associada à deficiência de cálcio, mesmo com baixa quantidade de N- NH_4^+ (15%) em relação ao N total (Arruda Junior et al., 2011), e elevadas concentrações atmosféricas de CO_2 , como previstas para o futuro, não aliviam a toxicidade de NH_4^+ em tomateiro (Vega-Mas et al., 2015).

Com base no exposto, são raros os indícios de benefícios para o tomateiro quando se utiliza o N na forma amoniacal (Liu et al. 2017). No entanto, para a compreensão de mecanismos fisiológicos, como o controle do desenvolvimento pelos

hormônios, o tomateiro é uma espécie interessante, pois existem mutações e plantas transgênicas para essas substâncias (Pino-Nunes, 2009).

2.4 Citocininas e suas interações com o NH_4^+ e com o Si

As CKs são uma família de hormônios vegetais que regulam múltiplas respostas nas plantas, como a divisão celular e o transporte de nutrientes. A busca por CKs naturais das plantas levaram à identificação da tZ, da iP e da di-hidrozeatina (Ha et al., 2012). No entanto, a primeira CK descoberta (cinetina) não é derivada de plantas, mas, sim, da quebra do DNA do espermatozoide de arenque e foi identificada na busca por substâncias que promovessem a divisão celular em cultura de tecidos (Miller et al., 1956).

Com base e inspiração na descoberta da cinetina, vários estudos tiveram como objetivo desenvolver a CK sintética, através da modificação química da molécula de cinetina (Jiang e Asami, 2018). A 6-benziladenina (BA) é uma CK sintética de uso na agricultura, principalmente para aumentar a resistência de frutos a rachaduras (Ginzberg e Stern, 2016) e também foi indicada para atenuar o estresse salino (Wu et al., 2014).

Uma evidência experimental da interação entre CK e NH_4^+ surgiu com o trabalho de Walch-Liu et al. (2000), no qual, após a transferência de plantas de tabaco cultivadas em NO_3^- para uma solução nutritiva com NH_4^+ , a taxa de alongamento e a divisão celular das folhas diminuíram após 24 h, sem que houvesse alteração no teor de N. No entanto, os autores observaram a diminuição no conteúdo de CKs.

Nesse contexto, a tZ e a BA têm sido utilizadas em experimentos hidropônicos, via solução nutritiva, para aliviar estresses que resultam em diminuição no conteúdo de CK nas plantas, como a toxicidade de NH_4^+ e o estresse salino, sendo que a tZ tem a vantagem de ser a CK mais abundante e ativa encontrada nas plantas, e a BA ter o custo menor que a tZ (Shtratnikova et al., 2015; Wu et al., 2014).

Por fim, plantas de *A. thaliana* e de *S. bicolor* que acumularam Si, exibiram aumento da expressão dos genes *IPT7* e *ARR5*, que atuam na biossíntese de CKs e tiveram atraso na senescência foliar. Como a resposta foi semelhante nas duas espécies, os autores sugeriram um papel geral do Si no alívio de estresses por ter atuado no aumento da biossíntese de CKs (Markovich et al., 2017).

2.5 Uso de ferramenta genética para estudar as CKs

O MT, cultivar miniatura de tomateiro, apresenta tamanho reduzido (15 a 20 cm) e ciclo curto de vida (70 a 90 dias) (Meissner et al., 1997), sendo, portanto, amplamente utilizado em pesquisas que requerem condições mínimas de cultivo. Além disso, agora estão introgrididas em MT mutações desenvolvimentais, bem como tem sido realizados nesse cultivar transformações genéticas que têm permitido explorar várias respostas bioquímicas e/ou moleculares (Carvalho et al., 2011). Especialmente, o transgênico *MT CKX2* apresenta baixo teor de CKs devido à superexpressão da enzima citocinina oxidase (Pino-Nunes, 2009). Esta enzima cliva a cadeia lateral da *trans*-zeatina (*tZ*) e da isopenteniladenina (*iP*), tornando-as inativas e de forma irreversível. No entanto, a di-hidrozeatina é resistente à clivagem. Vale ressaltar que plantas com superexpressão da enzima citocinina oxidase e, consequentemente, com menor teor de CKs, são importantes para gerar informações sobre os processos que as CKs regulam (Werner et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Campo do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 h, irradiação de $70 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida com lâmpadas tubulares fluorescentes. As temperaturas do ar no local de cultivo das plantas foi de $26/22 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (dia/noite), e a umidade relativa do ar foi entre 35 e 45%.

As sementes do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), do cultivar MT foram semeadas em bandejas de poliestireno, contendo vermiculita e o substrato Bioplant® (1:1, v:v). As bandejas ficaram suspensas com suportes de 5 cm, para evitar o contato das raízes com a bancada de cultivo e sua danificação com a remoção das plantas para o transplântio. A umidade do substrato foi mantida com água potável, com auxílio de um regador manual, uma vez por dia, e interrompida a rega aos primeiros sinais de drenagem.

Quando as plantas estavam com duas folhas não expandidas (12 dias após a semeadura, DAS), foram retiradas das bandejas, o substrato foi removido das raízes com água corrente, e o colo foi envolto por espuma fenólica para fixar as plantas nos orifícios das placas de poliestireno, que foram colocadas sobre vasos de polipropileno,

com 11 cm de altura e 14 cm de largura, contendo 2 L de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950), com modificação na fonte de Fe para Fe-EDDHA, em todos os experimentos, e modificação nas fontes de Cu, Zn e Mn para EDTA, nos experimentos com o fornecimento de Si. Além disso, o fornecimento de Si teve início desde o transplântio, e a solução nutritiva foi preparada na seguinte sequência: adição do Si na água, ajuste do valor pH para $5,7 \pm 0,3$, adição dos nutrientes e novo ajuste do valor pH para $5,7 \pm 0,3$, caso necessário.

A solução nutritiva foi preparada com água deionizada e a 25% da força iônica. O valor pH foi monitorado diariamente e ajustado, sempre que necessário, para $5,7 \pm 0,3$ com soluções de NaOH ou HCl (10%). A solução foi aerada com compressor de ar durante o fotoperíodo. Quando as plantas estavam com duas folhas expandidas (19 DAS), a solução nutritiva foi modificada de acordo os tratamentos de cada experimento.

A época de aplicação dos tratamentos com NH_4^+ foi definida em pré-experimento, uma vez que, no dia do transplântio, as plantas morreram com as concentrações de NH_4^+ acima de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Aos 7 dias após o transplântio (ou 19 DAS), as plantas ficaram menores nas concentrações de NH_4^+ acima de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ antes de atingirem a fase reprodutiva, e aos 14 dias após o transplântio, as plantas atingiram a fase reprodutiva sem apresentar os sintomas de toxicidade de NH_4^+ . Assim, a época de aplicação dos tratamentos com NH_4^+ foi aos 19 DAS. Em todos os experimentos, quando as plantas estavam com 6 folhas expandidas (entre 37 e 39 DAS), as avaliações e as coletas para as análises foram realizadas.

3.1 Experimento para identificar a concentração tóxica de NH_4^+

Os tratamentos foram com as concentrações de 0,25; 1,25; 2,5; 5 e $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4^+ (Tabela 1), com quatro repetições e quatro plantas por repetição, dispostos em delineamento experimental em blocos casualizados (DBC). A fonte de NH_4^+ utilizada foi o NH_4Cl . A solução nutritiva foi renovada a cada quatro dias, e a forma de preparo e de manejo foram iguais às descritas no item 3.

3.1.1 Avaliações

Tabela 1. Composição da solução nutritiva com concentrações de NH_4^+ .

Solução-estoque (mol L ⁻¹)	Concentrações de NH_4^+ (mmol L ⁻¹)				
	0,25	1,25	2,5	5	7,5
	----- mL L ⁻¹ -----				
KH_2PO_4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO_4	1	1	1	1	1
KCl	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
NH_4Cl	0,25	1,25	2,5	5	7,5
CaCl_2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Micronutrientes ⁽¹⁾	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fe-EDDHA ⁽²⁾	1	1	1	1	1

⁽¹⁾Para 1 L: 2,86 g H_3BO_3 ; 1,81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,10 g ZnCl_2 ; 0,04 g CuCl_2 ; 0,02 g $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. ⁽²⁾83,3 g L⁻¹ Fe-EDDHA (6%).

Índice de cor verde: as leituras do índice de cor verde foram realizadas com clorofilômetro (Modelo CCM-200 Plus da Opti-Sciences®), na quarta e na quinta folhas expandidas, de cima para baixo, em duas plantas por vaso.

Índice de vazamento de eletrólitos na folha (VEf): a parte aérea foi enxaguada em água potável corrente e água deionizada. Foram coletados 10 discos (6 mm de diâmetro cada), da quarta e quinta folhas, de uma planta por vaso. Os discos foram colocados em Becker de vidro com 20 mL de água deionizada a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Após duas horas, a condutividade elétrica inicial (CEi) foi registrada. Os Beckers foram vedados com papel-alumínio e autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Quando as amostras retornaram à temperatura ambiente, a condutividade elétrica final (CEf) foi registrada. O VE foi calculado como: $\text{VEf (\%)} = (\text{CEi}/\text{CEf}) \times 100$ (Dionisio-Sese e Tobita, 1998).

Área foliar: a área foliar sem o pecíolo, de duas plantas por vaso, foi medida com o medidor de área foliar (L-3100, Li-Cor).

Massa seca da parte aérea e das raízes: duas plantas por vaso foram separadas em parte aérea e raízes. A parte aérea foi lavada em água corrente, detergente neutro (0,1%), ácido clorídrico (0,3%) e água deionizada. O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar forçada a 65 ± 5 °C até obter massa constante. Após a secagem, a massa seca da parte aérea e das raízes foi obtida em balança analítica.

Teor e acúmulo de N na parte aérea: após obter a massa seca, a parte aérea foi moída em moinho tipo Willey e realizada a análise química do teor de N (Bataglia

et al.,1983). A partir do teor de N na parte aérea e da massa seca da parte aérea, foi calculado o acúmulo de N.

Análise estatística: os dados foram analisados utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011). Procedeu-se à análise de variância, pelo teste F ($p \leq 0,05$), quando significativa, e as médias obtidas com as concentrações de NH_4^+ foram submetidas à análise de regressão polinomial ($p \leq 0,05$).

3.2 Experimento com proporção tóxica de NO_3^- e NH_4^+ , e concentrações de Si na forma de silicato de potássio ou ácido silícico estabilizado

Foi realizado um experimento em esquema fatorial 2×5 , sendo duas fontes de Si: silicato de potássio (SiK) e ácido silícico estabilizado (ASiE), e cinco concentrações de Si: 0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mmol L^{-1} (Tabela 2), com quatro repetições e quatro plantas por repetição, dispostos em DBC.

A concentração de N foi de 15 mmol L^{-1} , na proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (%) de 25/75, que resultou em diminuição da massa seca da parte aérea em 26,25 %, em relação a 15 mmol L^{-1} de NO_3^- (100% de NO_3^-) (Barreto et al., 2018).

Teste visual de homogeneidade da solução nutritiva: devido à facilidade do Si via ASiE polimerizar, foi realizado um teste subjetivo para determinar o tempo de renovação da solução nutritiva. A mesma foi preparada com 0,8 mmol L^{-1} de Si (máxima concentração de ASiE sem que houvesse a polimerização imediata), adicionada nos vasos (2 L) e aerada com injeção de ar. Para o monitoramento, a solução foi transferida para recipiente plástico transparente e fotografada a 0; 24; 48 e 72 horas após o preparo da solução (Figura 1). Com 72 h, a solução nutritiva não era mais homogênea e apresentou aspecto turvo, indicativo da polimerização do Si (Figura 1d). Dessa forma, a renovação da solução nutritiva (Tabela 2) foi realizada a cada dois dias.



Figura 1. Solução nutritiva com 0,8 mmol L^{-1} de Si via ácido silícico estabilizado a 0 h, 24 h, 48 h e 72 h após o preparo.

Tabela 2. Composição da solução nutritiva com fontes e concentrações de Si.

Solução-estoque (mol L ⁻¹)	Concentrações de Si (mmol L ⁻¹)								
	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0,2	0,4	0,6	0,8
	----- mL L ⁻¹ -----								
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NH ₄ Cl	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2	11,2
KCl	2,5	2,38	2,26	2,15	2,03	2,5	2,5	2,5	2,5
Ca(NO ₃) ₂	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
CaCl ₂	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
SiK ⁽¹⁾	-	0,043	0,087	0,13	0,17	-	-	-	-
ASiE ⁽²⁾	-	-	-	-	-	0,4	0,8	1,2	1,6
Micronutrientes ⁽³⁾	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fe-EDDHA ⁽⁴⁾	1	1	1	1	1	1	1	1	1

SiK: ⁽¹⁾Silicato de potássio: 128 g L⁻¹ Si, 126 g L⁻¹ K₂O; ⁽²⁾ácido silícico estabilizado: 14 g L⁻¹ Si. ⁽³⁾Para 1 L: 2,86 g H₃BO₃; 0,02 g H₂MoO₄H₂O; 3,87 g Mn-EDTA (12%); 0,343 g Zn-EDTA (14%), 0,126 g Cu-EDTA (15%). ⁽⁴⁾83,3 g L⁻¹ Fe-EDDHA (6%).

3.2.1 Avaliações

Altura de plantas: foram realizadas avaliações em duas plantas por vaso, as medidas foram feitas desde a base da espuma fenólica até à inserção da última folha, com auxílio de uma régua.

Clorofilas e carotenoides: foram realizadas na quarta folha de uma planta por unidade experimental. 0,025-0,030 g de massa fresca foram adicionadas em Eppendorf protegido da luz, contendo 1,5 mL de acetona a 80%. As amostras ficaram a 4°C por 48 horas. Os extratos foram medidos em 663 nm (clorofila A), 647 nm (clorofila B) e 470 nm (carotenoides), e a concentração de cada pigmento foi obtida empregando-se as equações correspondentes (Lichtenthaler, 1987).

Teor e acúmulo de Si: antes de realizar a análise, era feito o teste para detectar se a água estava sem Si, da seguinte forma: 20 mL de água a ser analisada, 1 mL de ácido clorídrico (500 mL L⁻¹) e 2 mL de molibdato de amônio (100 g L⁻¹). Caso houvesse Si na água, a solução ficava com tonalidade amarela e não era usada para análise.

Todos os materiais utilizados na análise foram enxaguados em água sem Si detectável no teste descrito anteriormente. Após os procedimentos descritos no item 3.2 (massa seca da parte aérea e das raízes), o teor de Si foi determinado (Korndörfer et al., 2004), sendo necessário concentrar a amostra na primeira diluição, ou seja,

após a digestão, e ao invés de acertar o volume final da solução para 50 mL, foi acertado para 25 mL, com respectivos ajustes aos fatores de diluição. A partir do teor e da massa seca da parte aérea, calculou-se o acúmulo de Si na parte aérea das plantas.

Índice de vazamento de eletrólitos nas raízes (VER): a raiz foi enxaguada em água potável corrente e água deionizada. Foram coletados 10 segmentos da parte central da raiz (2 cm cada) e colocados em Becker de vidro com 20 mL de água deionizada à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Após duas horas, a condutividade elétrica inicial (CEi) foi registrada. Os Beckers foram vedados com papel-alumínio e autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Quando as amostras retornaram à temperatura ambiente, a condutividade elétrica final (CEf) foi registrada. O VER foi calculado como: $VER (\%) = (CEi/CEf) \times 100$ (Dionisio-Sese e Tobita, 1998).

Índice de vazamento de eletrólitos na folha, área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes: utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 3.1.1.

Análise estatística: os dados foram analisados utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011). Procedeu-se à análise de variância, pelo teste F, para as fontes e concentrações de Si ($p \leq 0,05$). Quando a análise de variância para as concentrações de Si foi significativa, procedeu-se à análise de regressão polinomial ($p \leq 0,05$). Mesmo não havendo interação, optou-se por apresentar o desdobramento da interação.

3.3 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de Si

A partir do item 3.1, foi escolhida a concentração de 5,9 mmol L⁻¹ NH_4^+ , que resultou em diminuição da massa seca da parte aérea em 10 %, em relação ao ponto de máximo crescimento (Figura 3b), e utilizada a mesma concentração de NO_3^- como controle.

A solução nutritiva foi modificada para fornecer 5,9 mmol L⁻¹ de N na forma de NO_3^- ou NH_4^+ e concentrações de Si: 0; 1; 2 e 2,5 mmol L⁻¹ (Tabela 3). O experimento foi disposto no DBC, com 4 repetições.

3.3.1 Avaliações

Tabela 3. Composição da solução nutritiva com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de Si.

Solução-estoque (mol L ⁻¹)	----- NO ₃ ⁻ -----				----- NH ₄ ⁺ -----			
	-----Concentrações de Si (mmol L ⁻¹) -----							
	0	1	2	2,5	0	1	2	2,5
	----- mL L ⁻¹ -----							
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄	1	1	1	1	1	1	1	1
KCl	2,5	1,91	1,32	1,03	2,5	1,91	1,32	1,03
NH ₄ Cl	-	-	-	-	5,9	5,9	5,9	5,9
Ca (NO ₃) ₂	2,95	2,95	2,95	2,95	-	-	-	-
CaCl ₂	-	-	-	-	2,95	2,95	2,95	2,95
SiK ⁽¹⁾	-	0,22	0,44	0,55	-	0,22	0,44	0,55
Micronutrientes ⁽²⁾	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fe-EDDHA ⁽³⁾	1	1	1	1	1	1	1	1

⁽¹⁾Silicato de potássio: 128 g L⁻¹ Si, 126 g L⁻¹ K₂O. ⁽²⁾Para 1 L: 2,86 g H₃BO₃; 0,02 g H₂MoO₄H₂O; 3,87 g Mn-EDTA (12%); 0,343 g Zn-EDTA (14%), 0,126 g Cu-EDTA (15%). ⁽³⁾83,3 g L⁻¹ Fe-EDDHA (6%).

Índice de vazamento de eletrólitos nas folhas, área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes e teor e acúmulo de N: foram avaliados conforme descrito no item 3.1.1.

Altura das plantas, clorofila total e carotenoides, índice de vazamento de eletrólitos nas raízes e teor e acúmulo de Si: foram avaliados conforme descrito no item 3.2.1

Análise estatística: os dados foram analisados utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011). Procedeu-se à análise de variância, pelo teste F, para as formas de N e concentrações de Si ($p \leq 0,05$). Quando a análise de variância para as concentrações de Si foi significativa, procedeu-se à análise de regressão polinomial ($p \leq 0,05$). Mesmo não havendo interação, optou-se por apresentar o desdobramento da interação.

3.4 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e Si no tomateiro MT e no MT CKX2

3.4.1 MT

Tentativa de substituição das fontes de Ca por Ca-EDTA: devido à restrita disponibilidade do Ca-EDTA no mercado, o presente produto foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição de Plantas, após testes, da seguinte forma: foram dissolvidos 93,05 g de “Disodium EDTA” (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O, Mapric®) em 900 mL de água

deionizada, com a adição de NaOH em micropérolas até o valor pH 8,0). Em outro Becker, foram dissolvidos 36,75 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada, e o valor pH foi elevado para 8,0. As soluções dissolvidas com EDTA e com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ totalizaram 1L, foram colocadas em frasco plástico que impedia a entrada de luz e permaneceram em agitação a 100 RPM, por 12h. Por fim, o Ca-EDTA ficou transparente e homogêneo.

Até aos 18 DAS, os procedimentos foram iguais aos descritos no item 3. Dos 19 aos 22 DAS, foi utilizada a solução nutritiva descrita na Tabela 4. A partir dos 23 DAS, o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi substituído por KNO_3 , e o CaCl_2 deixou de ser utilizado. O Ca passou a ser fornecido na forma de quelato (EDTA). O valor pH e a condutividade elétrica da solução nutritiva foram semelhantes, substituindo ou não o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e o CaCl_2 por Ca-EDTA, mas com o Ca-EDTA, plantas foram murchando e morreram aos 27 DAS, ou seja, o Ca-EDTA ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) foi tóxico.

Dessa forma, o experimento foi iniciado novamente, com os procedimentos iguais aos descritos no item 3, até aos 18 DAS. A partir dos 19 DAS, a solução nutritiva foi modificada para fornecer $5,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de N na forma de NO_3^- ou NH_4^+ , na ausência ou na presença de Si (Tabela 4), na concentração de $1,28 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 9c). O experimento foi disposto em DBC, com 7 repetições.

Tabela 4. Composição da solução nutritiva com NO_3^- e NH_4^+ , sem e com Si.

Solução-estoque (mol L^{-1})	NO_3^-	$\text{NO}_3^- + \text{Si}$	NH_4^+	$\text{NH}_4^+ + \text{Si}$
	----- mL L^{-1} -----			
KH_2PO_4	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO_4	1	1	1	1
KCl	2,5	1,75	2,5	1,75
NH_4Cl	-	-	5,9	5,9
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2,95	2,95	-	-
CaCl_2	-	-	2,95	2,95
$\text{SiK}^{(1)}$	-	0,28	-	0,28
Micronutrientes ⁽²⁾	0,5	0,5	0,5	0,5
Fe-EDDHA ⁽³⁾	1	1	1	1

⁽¹⁾Silicato de potássio: 128 g L^{-1} Si, 126 g L^{-1} K_2O . ⁽²⁾Para 1 L: $2,86 \text{ g H}_3\text{BO}_3$; $0,02 \text{ g H}_2\text{MoO}_4\text{H}_2\text{O}$; $3,87 \text{ g Mn-EDTA}$ (12%); $0,343 \text{ g Zn-EDTA}$ (14%), $0,126 \text{ g Cu-EDTA}$ (15%). ⁽³⁾ $83,3 \text{ g L}^{-1}$ Fe-EDDHA (6%).

3.4.1 Avaliações

Quantificação de citocininas: duas raízes de cada repetição foram enxaguadas em água potável corrente e água deionizada, sendo separadas da parte aérea e transferidas para tubos Falcon de 15 mL. A parte aérea foi transferida para tubos Falcon de 50 mL. Os tubos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e levados ao liofilizador (Savant Super Modulyo), por 72 horas. Após a liofilização, as amostras foram armazenadas em embalagem plástica de forma a evitar o contato com o ar.

Os tecidos liofilizados da parte aérea e das raízes foram utilizados para a quantificação de CKs. As amostras das raízes e da parte aérea, aproximadamente 50 mg, foram maceradas em nitrogênio líquido com adição de 1,8 mL da solução de extração (80% de metanol, 1% de ácido acético e 19% de água destilada) e acondicionadas em tubos de 2 mL. Posteriormente, foram adicionados os padrões internos do respectivo hormônio a ser quantificado. Essa mistura permaneceu sob agitação por 1 h a 4 °C, foram centrifugadas a 10.000 g por 4 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e acondicionado em novo tubo de 2 mL e mantido em repouso por 24 h a -20 °C para a precipitação das proteínas, então as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 4 minutos a 4 °C, e o sobrenadante, transferido para tubos de vidro de 5 mL, sendo as amostras concentradas em rotovapor por 3 h. As amostras concentradas foram completadas para 1 mL com 1% de ácido acético, e após rápida agitação, a mistura foi filtrada em colunas Oasis HLB® (fase reversa). Os hormônios foram recuperados aplicando 1 mL de metanol a 95%. Novamente as amostras foram secas em rotovapor (Thermo Scientific®) e posteriormente dissolvidas com 150 µL de acetonitrila (5%) + ácido acético (1%). Finalmente, as leituras foram realizadas em espectrômetro de massas de alta resolução acoplado a “Ultra-high Performance LiquidChromatography” (UHPLC) (Thermo Scientific®) (Seo et al., 2011).

MDA e H₂O₂: por volta de 250 mg de material vegetal (uma raiz após o excesso de água ser retirado em papel toalha, e a quarta e quinta folhas, de cima para baixo) tiveram a massa fresca registrada e foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, o material vegetal foi armazenado em temperatura de -80 °C para a quantificação do teor de malondialdeído (MDA) e de H₂O₂.

O teor de MDA foi determinado por meio do teste do ácido 2 tiobarbitúrico (TBA) descrito por Heath e Packer (1968). Os metabólitos reativos das membranas celulares, principalmente o MDA, reagem com o TBA e podem ser quantificados a partir da espectrofotometria. As amostras frescas foram maceradas com 1 mL de ácido tricloroacético a 0,1% (TCA), juntamente com 20% de polivinilpolipirrolidona, em banho de gelo. Após a homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 250 µL ao qual foi adicionado 1 mL de TCA a 20% e TBA a 0,5%. Os procedimentos foram realizados em triplicata. A mistura foi colocada em banho seco por 30 minutos, a 95°C, e resfriada em gelo, na sequência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 535 e 600 nm.

O conteúdo de H₂O₂ foi determinado a partir da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). As amostras frescas foram maceradas com 1 mL de TCA a 0,1% e acrescidas de 20% de polivinilpolipirrolidona, em banho de gelo. Após a homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 200 µL, aos quais foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de KI, sendo a reação realizada em triplicatas. O branco consistiu na mesma mistura descrita acima; porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocaram-se 200 µL de TCA a 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm.

Área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes, teor e acúmulo de N: foram avaliados conforme descrito no item 3.1.1.

Altura das plantas, clorofila total e carotenoides, e teor e acúmulo de Si: foram avaliados conforme descrito no item 3.2.1.

Análise estatística: os dados foram analisados utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011). Procedeu-se à análise de variância, pelo teste F ($p \leq 0,05$). Mesmo não havendo interação, optou-se por apresentar o desdobramento da interação.

3.4.2 MT CKX2

As únicas alterações no experimento com o tomateiro transgênico em citocininas (*MT CKX2*), em relação ao MT (item 3.4.1), foram no transplante, realizado aos 22 DAS, na quantificação de MDA e H_2O_2 , em que se utilizaram em torno de 180 mg de massa fresca (uma raiz com o excesso de água retirado com papel toalha e todas as folhas), e não foram realizadas as avaliações de quantificação de CKs e Si.

3.5 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de BA associadas ao NH_4^+

Foi realizado um experimento para verificar se a aplicação de BA atenua a toxicidade de NH_4^+ . A partir dos 19 DAS, a solução nutritiva foi modificada para fornecer $5,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de N, nas formas de NO_3^- (controle) e NH_4^+ associado às concentrações de 0; $1e^{-10}$; $1e^{-9}$; $1e^{-8}$; $1e^{-7}$ e $1e^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de 6-benziladenina (BA) (Tabela 5). Os tratamentos foram dispostos em DBC, com 4 repetições. As concentrações de BA foram as mesmas utilizadas por Shtratnikova et al. (2015); no entanto, em *A. thaliana* e com a fonte tZ.

Tabela 5. Composição da solução nutritiva com NO_3^- e NH_4^+ , e concentrações de BA associadas ao NH_4^+ .

Solução-estoque (mol L ⁻¹)	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺					
	Concentrações de 6-benziladenina (BA, mol L ⁻¹)						
	0	0	1e ⁻¹⁰	1e ⁻⁹	1e ⁻⁸	1e ⁻⁷	1e ⁻⁶
	mL L ⁻¹						
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄	1	1	1	1	1	1	1
KCl	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
NH ₄ Cl	-	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
Ca(NO ₃) ₂	2,9	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂	-	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
BA ⁽¹⁾ (μmol L ⁻¹)	-	-	0,1	1	10	100	1 ⁽²⁾
Micronutrientes ⁽³⁾	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fe-EDDHA ⁽⁴⁾	1	1	1	1	1	1	1

⁽¹⁾ $C_{12}H_{11}N_5$. ⁽²⁾Solução estoque a 1 mmol L^{-1} . ⁽³⁾Para 1 L: 2,86 g H_3BO_3 ; 0,02 g $H_2MoO_4 \cdot H_2O$; 3,87 g Mn-EDTA (12%); 0,343 g Zn-EDTA (14%), 0,126 g Cu-EDTA (15%). ⁽⁴⁾ $83,3 \text{ g L}^{-1}$ Fe-EDDHA (6%).

3.5.1 Avaliações

Diâmetro e área das raízes: coletou-se um grama de raiz por planta, em duas plantas por unidade experimental; logo após, foram armazenadas em solução de álcool a 20% e conservadas sob refrigeração; posteriormente, as raízes foram submetidas por cinco minutos à coloração com azul de metileno; em seguida, lavadas em água corrente, para a retirada do excesso da coloração, e levadas a um escâner Hewlett Packard. Após este procedimento, determinaram-se a área e o diâmetro médio das raízes por meio do software Delta-T Scan Root Analysis System.

Altura de plantas: foi realizada conforme descrito no item 3.2.1.

Área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes: foram realizadas conforme descrito no experimento 3.1.1.

Análise estatística: os dados foram analisados utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011). Procedeu-se à análise de variância, pelo teste F ($p \leq 0,05$). Quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento para identificar a concentração tóxica de NH_4^+

4.1.1 Teor e acúmulo de N na parte aérea, índice de cor verde e índice de vazamento de eletrólitos

O teor de N na parte aérea do MT aumentou em função do aumento das concentrações de NH_4^+ na solução nutritiva, até $4,9 \text{ mmol L}^{-1}$, e passou a diminuir a partir dessa concentração (Figura 2a). Resultados semelhantes foram observados para o acúmulo de N na parte aérea, onde o ponto máximo ocorreu com a concentração de $4,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4^+ (Figura 2b). O índice de cor verde e o índice de vazamento de eletrólitos passaram a diminuir e a aumentar, respectivamente, com a concentração de NH_4^+ por volta de $2,8 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figuras 2c e 2d).

4.1.2 Área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes

Houve aumento na área foliar das plantas de MT em função das concentrações de NH_4^+ , até $4,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 3a). A massa seca da parte aérea aumentou até à

concentração de $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 3b) e houve aumento da massa seca das raízes até à concentração de NH_4^+ de $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 3c).

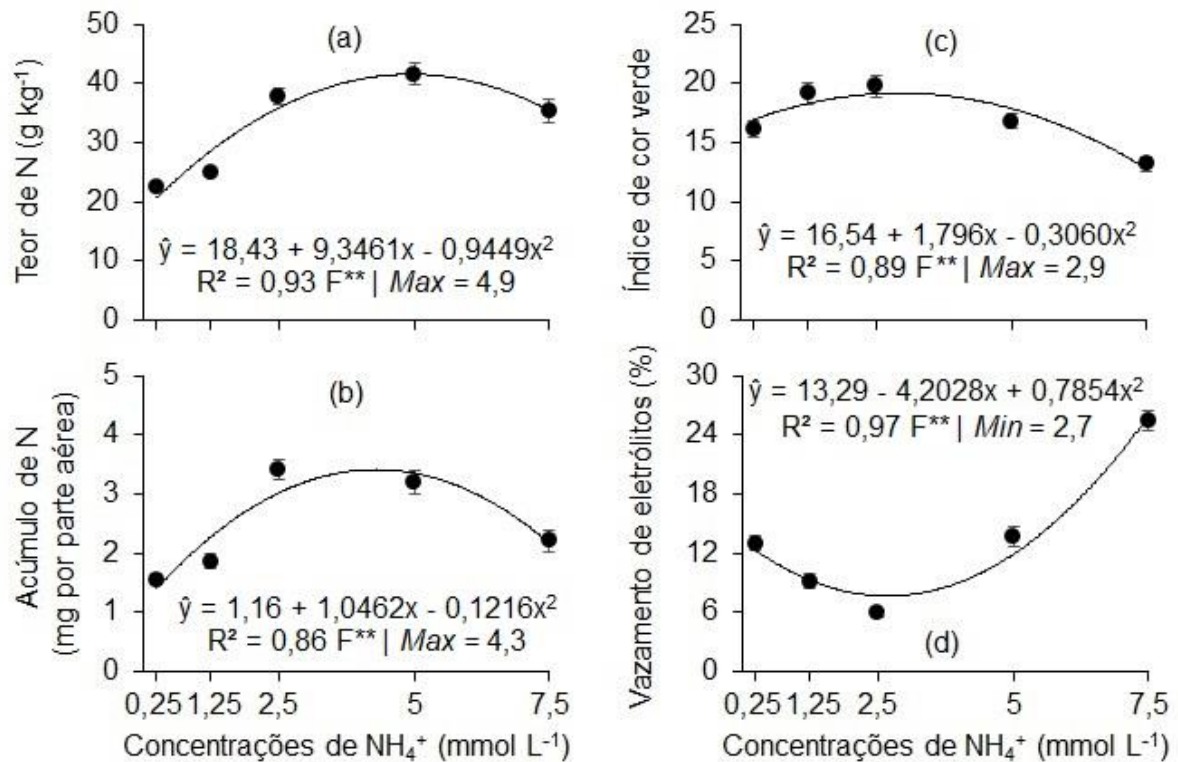


Figura 2. Teor (a) e acúmulo de N na parte aérea (b), índice de cor verde (c) e vazamento de eletrólitos na folha (d) do tomateiro cultivado em solução nutritiva, com concentrações de NH_4^+ . **: significativo a 1%, pelo teste F. Máx e Mín: ponto de máximo e mínimo da regressão, respectivamente.

Com base nos dados de massa seca da parte aérea (Figura 3b), os teores de N da parte aérea (Figura 2a), correspondentes a 90% da máxima massa seca (por deficiência), máxima massa seca e 90% da máxima massa seca (por excesso), foram de 27,5; 39,5 e 40,6 g kg^{-1} , respectivamente. Ou seja, os teores de N, correspondentes à máxima massa seca e à toxicidade, foram próximos.

Os valores próximos das concentrações de NH_4^+ referentes à máxima massa seca da parte aérea e à diminuição de 10%, sendo esse o nível crítico de toxicidade (Davis et al., 1978), ocorreram porque o NH_4^+ não pode ser acumulado nas células. Quando isso ocorre, vários processos são afetados, como o gradiente de pH necessário ao transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração (Britto e

Kronzucker, 2002), tem-se o menor acúmulo de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} (Barreto et al., 2018) e aumento do estresse oxidativo (Esteban et al., 2016).

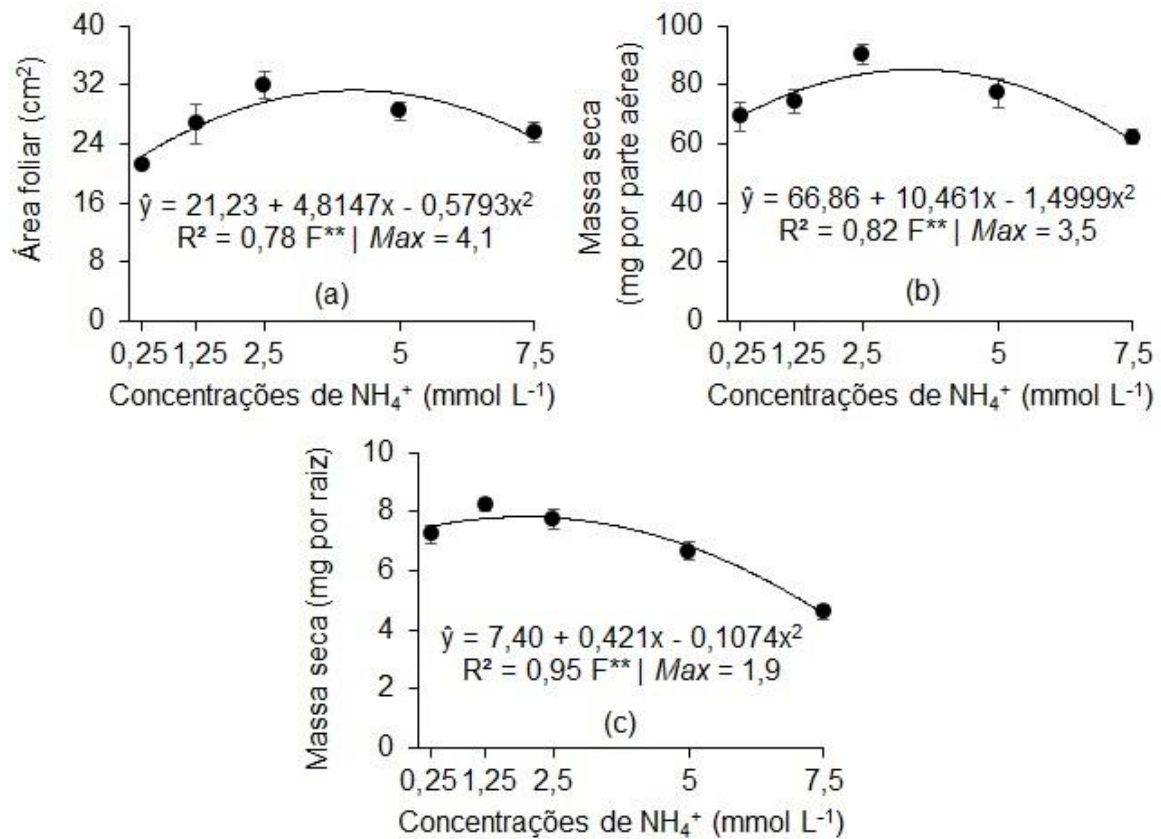


Figura 3. Área foliar (a), massa seca da parte aérea (b) e da raiz (c) do tomateiro cultivado em solução nutritiva, com concentrações de NH_4^+ . **: significativo a 1%, pelo teste F. Max: ponto de máximo da regressão.

Como o K^+ e o NH_4^+ são semelhantes em relação à valência e ao raio iônico, eles podem não ser distinguidos pelos transportadores das membranas. Assim, em altas concentrações de NH_4^+ , os transportadores de K^+ podem absorver NH_4^+ (Ten Hoopen et al., 2010).

A diminuição do índice de cor verde, com as concentrações acima de 2,9 mmol L⁻¹ de NH_4^+ (Figura 2c), e o aumento no índice de vazamento de eletrólitos com as concentrações acima de 2,7 mmol L⁻¹ de NH_4^+ (Figura 2d) indicam que o NH_4^+ passou a ser tóxico, pois o índice de cor verde é uma medida indireta do teor de clorofilas (Marouani et al., 2015); e o índice de vazamento de eletrólitos é correlacionado com o H_2O_2 , que tem sua produção aumentada em condições de estresse (Liu et al., 2013).

Contudo, com base na massa seca da parte aérea, a concentração de NH_4^+ , equivalente a 10% de diminuição do máximo crescimento ($5,9 \text{ mmol L}^{-1}$), gera a expectativa de que sua toxicidade possa ser aliviada com o uso do Si (Barreto et al., 2016).

4.2 Experimento com proporção tóxica de NO_3^- e NH_4^+ , e concentrações de Si na forma de silicato de potássio ou ácido silícico estabilizado

Não houve diferença nos parâmetros avaliados com as fontes e as concentrações de Si (Figuras 4 e 5); possivelmente, porque as concentrações de Si não resultaram em aumento do teor e do acúmulo do elemento benéfico na parte aérea (Figuras 4a e 4b).

A capacidade de absorção de Si pelas raízes é o fator mais importante para o acúmulo na parte aérea. Foi demonstrado por Mitani e Ma (2005) que ocorre a absorção ativa de Si pelo tomateiro, com afinidade semelhante ao transportador do arroz (planta acumuladora de Si) pelo ácido silícico ($0,16 \text{ mmol L}^{-1}$). No entanto, a grande diferença na quantidade acumulada de Si entre essas duas espécies indica que a quantidade de transportadores nas raízes do tomateiro é menor que no arroz. Assim, quando o tomateiro acumula Si, é possível que o mecanismo predominante seja a difusão passiva (Mitani e Ma, 2005).

Nesse contexto, é possível que, com concentrações de Si na solução nutritiva acima de $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$, o elemento benéfico seja acumulado na parte aérea.

Além disso, as folhas ficaram curvadas para baixo (Figura 6). A curvatura para baixo nas folhas das plantas com toxicidade de NH_4^+ é conhecida como epinastia, que, provavelmente, é induzida pela alteração da distribuição simétrica da auxina, que, por sua vez, ocorre pelo aumento da concentração do etileno em condições de estresses. Esse mecanismo foi demonstrado por Barker e Corey (1991) em tomateiro com toxicidade de NH_4^+ tratado com inibidor da síntese de etileno. As plantas tiveram diminuição do crescimento; no entanto, sem epinastia.

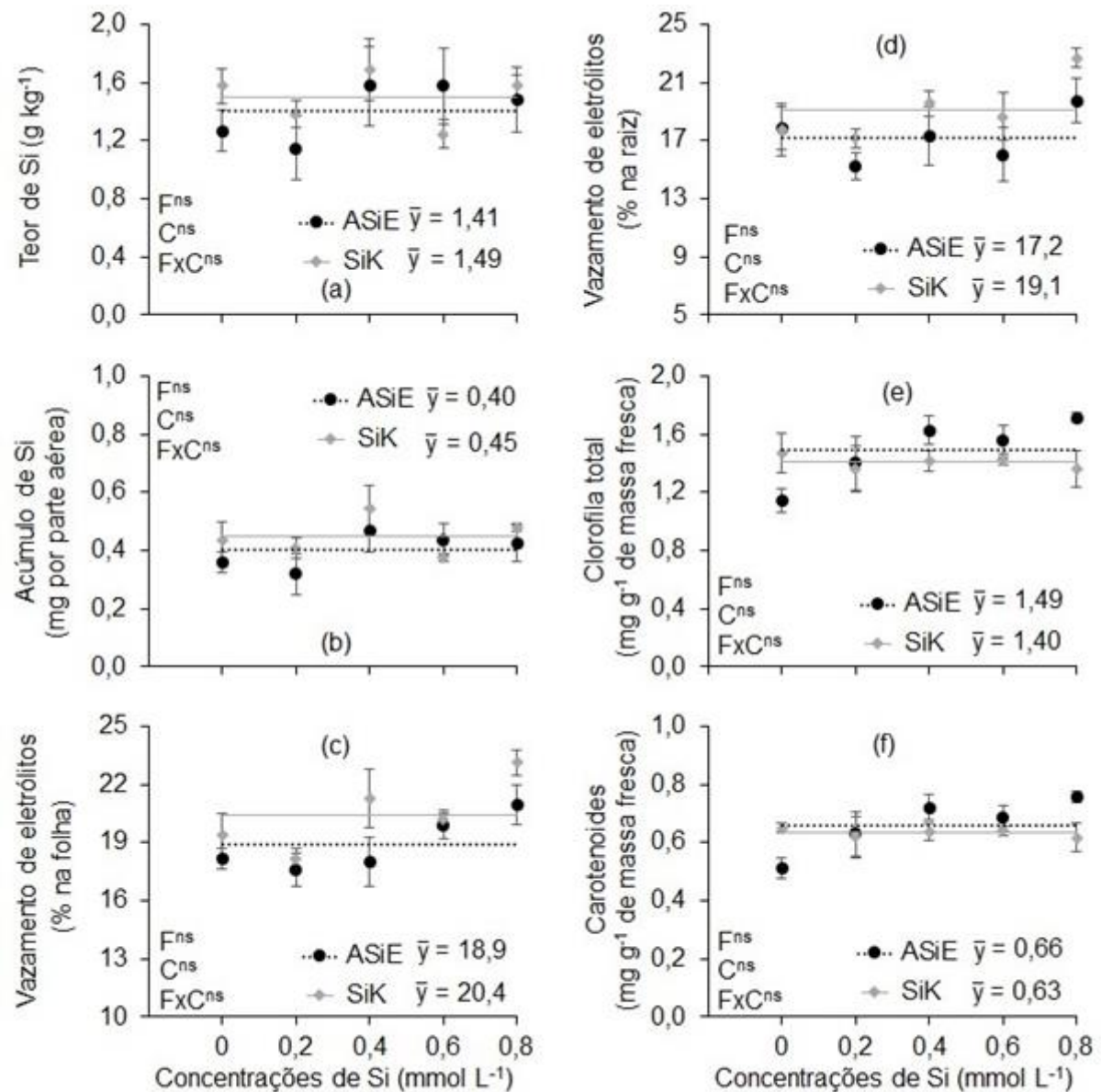


Figura 4. Teor (a) e acúmulo de Si na parte aérea (b), vazamento de eletrólitos na folha (c) e nas raízes (d), clorofila total (e) e carotenoides (f) do tomateiro cultivado em solução nutritiva, com proporção tóxica de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, e fontes e concentrações de Si. ASiE: ácido silícico estabilizado; SiK: silicato de potássio; F: fontes; C: concentrações; FxC: interação entre fontes e concentrações; ^{ns}: não significativo.

Em outro experimento desenvolvido nas mesmas condições (Barreto et al., 2018), a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (3,8/11,2 mmol L⁻¹) resultou em diminuição na massa seca da parte aérea de 26%, em relação a 15 mmol L⁻¹ de NO_3^- . Sobre esse aspecto, quando se comparam condições de menor e maior estresse associados ao Si, o

elemento benéfico tem sido mais eficiente nas condições de menor estresse (Kleiber et al., 2015; Barreto et al., 2016).

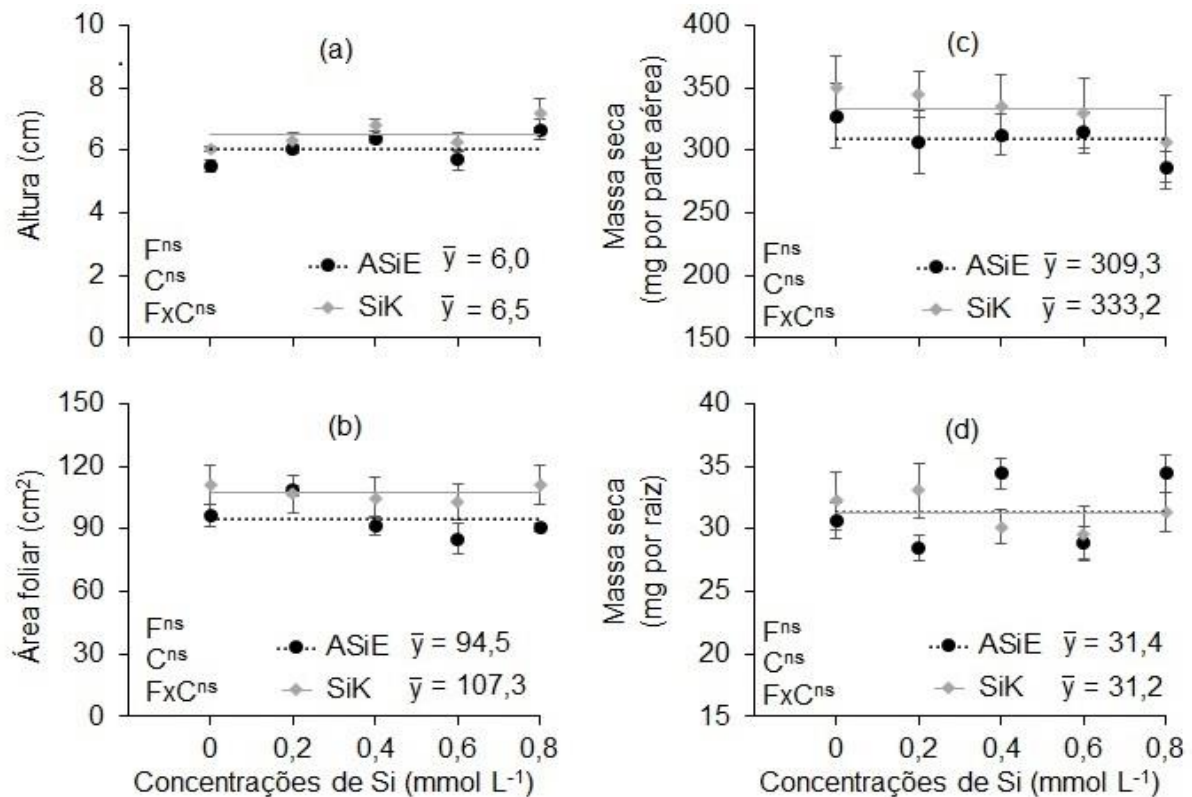


Figura 5. Altura (a), área foliar (b) massa seca da parte aérea (c) e das raízes (d) do tomateiro cultivado em solução nutritiva, com proporção tóxica de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, e fontes e concentrações de Si. ASiE: ácido silícico estabilizado; SiK: silicato de potássio; F: fontes; C: concentrações; FxC: interação entre fontes e concentrações; ^{ns}: não significativo.

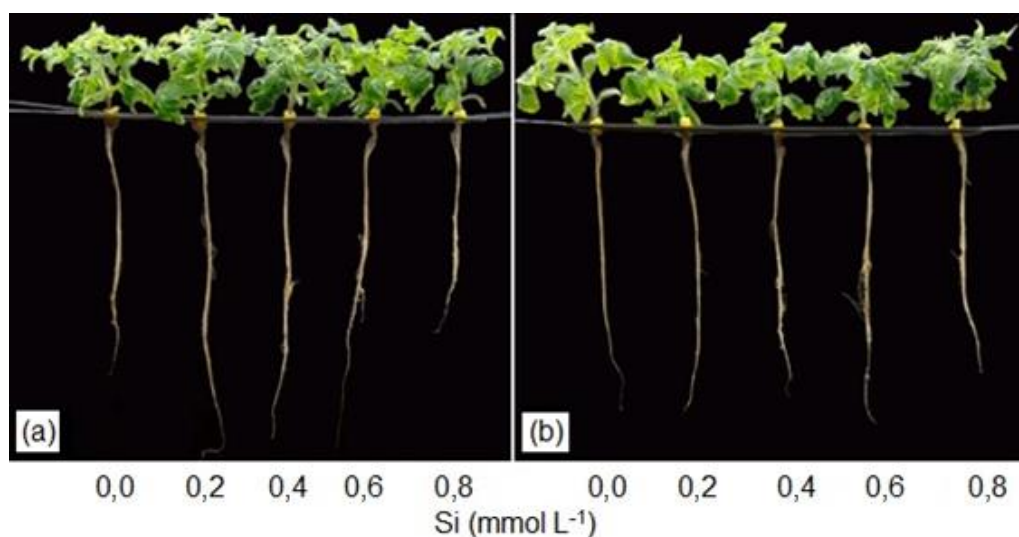


Figura 6. Tomateiro cultivado em proporção tóxica de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (3,8/11,2 mmol L⁻¹, respectivamente) e concentrações de Si, com as fontes ácido silícico estabilizado (a) e silicato de potássio (b).

Como no item 4.1 foi possível calcular a concentração de NH_4^+ na parte aérea do tomateiro, que resultou em diminuição de 10% na máxima produção de massa seca, considerada toxicidade moderada, espera-se que o Si alivie a toxicidade de NH_4^+ nessa condição de menor estresse.

4.3 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de Si

4.3.1 Teor e acúmulo de N

Houve interação entre as formas de N e as concentrações de Si para o teor e acúmulo de N na parte aérea do tomateiro MT (Figuras 7a e 7b). Nas plantas com NO_3^- , não houve efeito das concentrações de Si sobre o teor e o acúmulo de N. No entanto, nas plantas com NH_4^+ , obtiveram-se os pontos de máximo teor e acúmulo de N em função do aumento das concentrações de Si na solução nutritiva. Esses resultados sugerem que o teor crítico da toxicidade de NH_4^+ seja aumentado com o Si. Sobre esse aspecto, um importante papel do Si é estimular a atividade de enzimas antioxidantes que combatem as espécies reativas de oxigênio (Savvas e Ntatsi, 2015), que foram quantificadas no presente trabalho, de forma indireta, por meio do índice de vazamento de eletrólitos, que diminuiu em função do fornecimento de Si nas plantas cultivadas em NH_4^+ (Figuras 8c e 8d).

4.3.2 Teor e acúmulo de Si

Não houve interação entre as formas de N e as concentrações de Si para o teor e o acúmulo de Si (Figuras 7c e 7d). Contudo, com NO_3^- , o teor e o acúmulo de Si aumentaram com o incremento do elemento benéfico na solução nutritiva. No entanto, com NH_4^+ , o teor e o acúmulo de Si aumentaram até aos pontos máximos e passaram a diminuir com o aumento das concentrações de Si.

Mesmo com o aumento do teor de Si em função do fornecimento do elemento benéfico na solução nutritiva, as plantas continuaram sendo classificadas como não acumuladoras, pois os valores foram menores que 5 g kg^{-1} (Ma e Takahashi, 2002; Mitani e Ma, 2005).

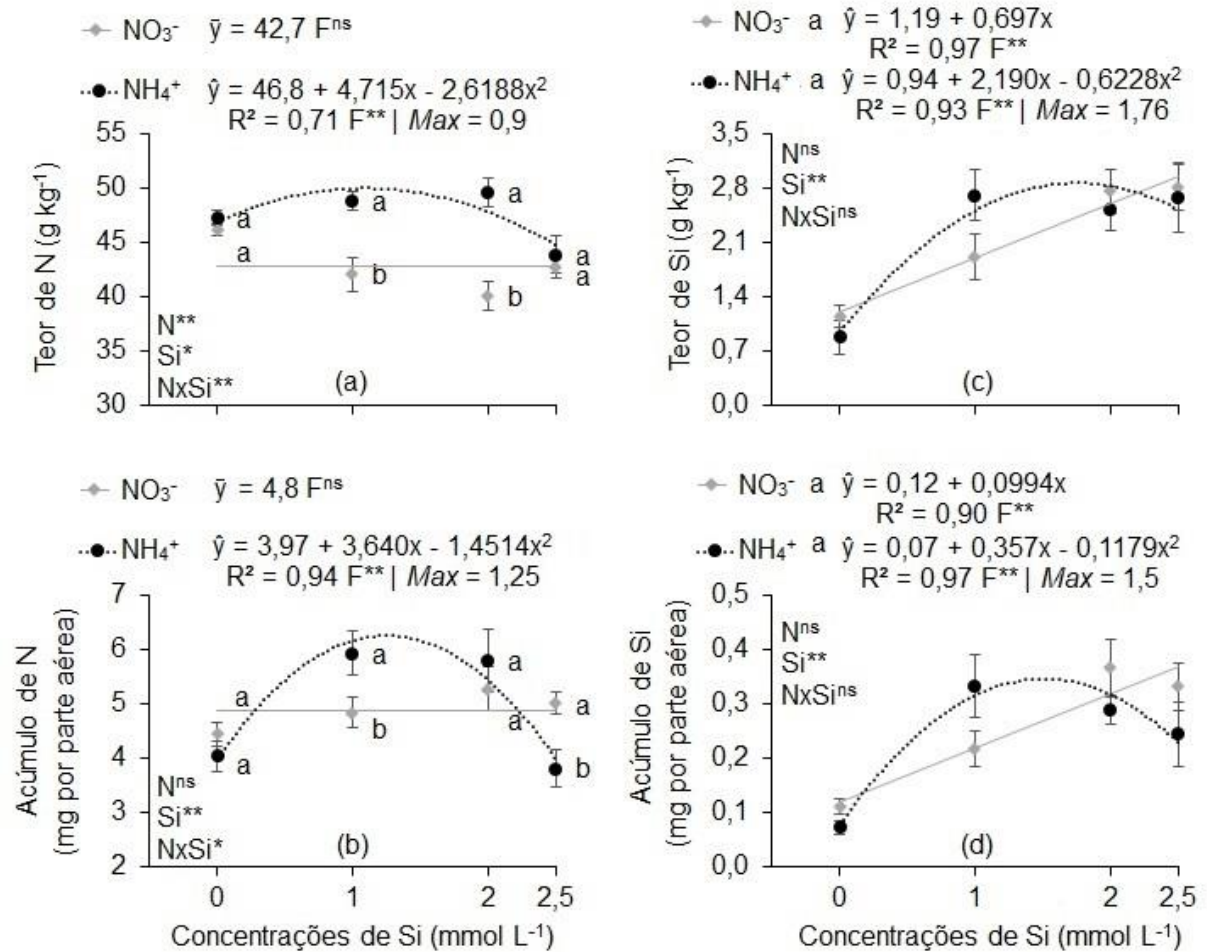


Figura 7. Teor (a) e acúmulo de N (b), teor (c) e acúmulo de Si (d) na parte aérea do tomateiro cultivado em solução nutritiva, com NO₃⁻ e NH₄⁺, e concentrações de Si. ns, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si pelo teste F. Max: ponto de máximo da regressão.

4.3.3 Clorofila, carotenoides e índice de vazamento de eletrólitos na parte aérea e nas raízes

Não houve interação entre as formas de N e as concentrações de Si para o teor de clorofila e de carotenoides (Figuras 8a e 8b). As plantas com NO₃⁻ na solução nutritiva tiveram maior teor de clorofila e de carotenoides, em relação às plantas nutridas com NH₄⁺. Enquanto houve aumento com ajuste linear na concentração dos pigmentos em função das concentrações de Si nas plantas com NO₃⁻, nas plantas com NH₄⁺, o aumento da concentração dos pigmentos foi até à concentração de 1,4

mmol L⁻¹. O índice de vazamento de eletrólitos nas folhas e nas raízes foi maior nas plantas com NH₄⁺ (Figuras 8c e 8d).

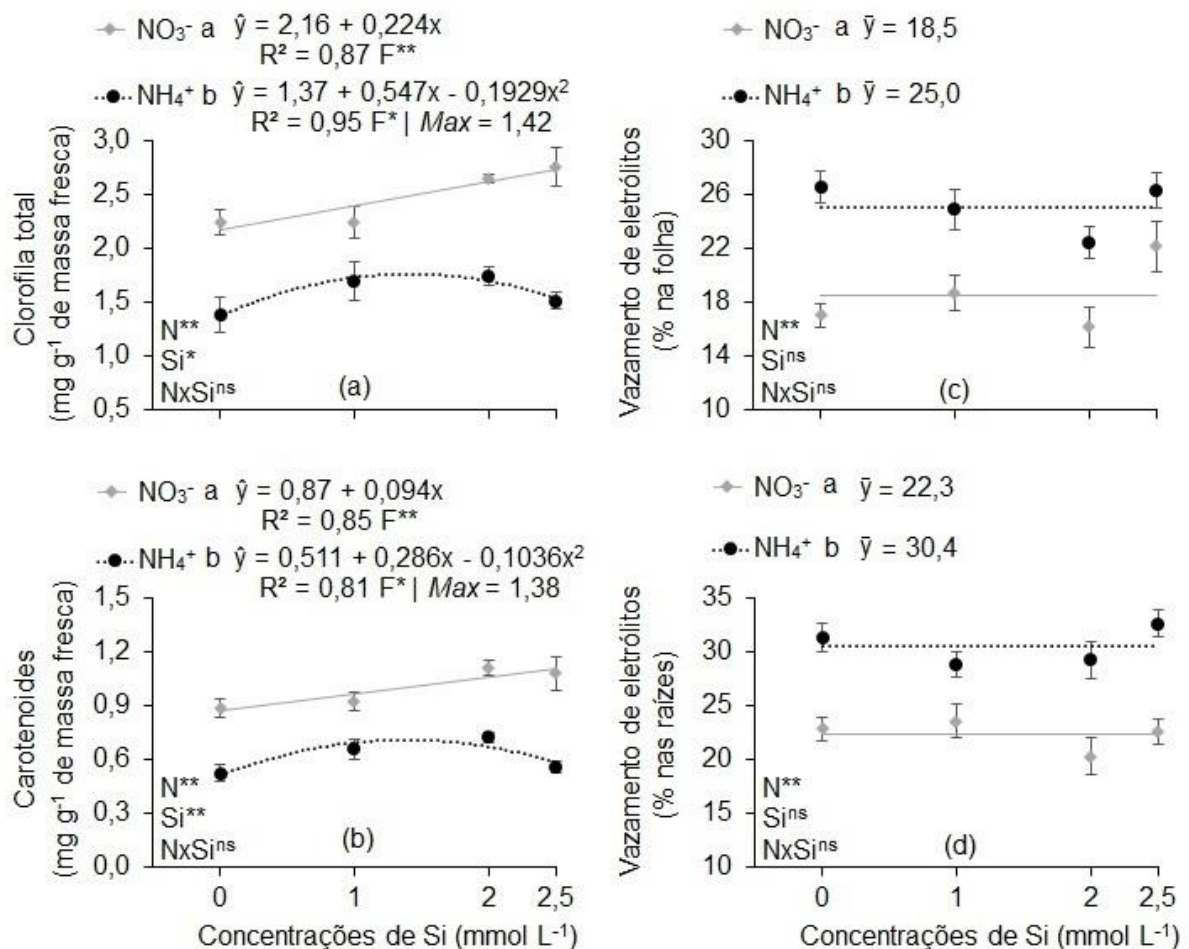


Figura 8. Clorofila total (a), carotenoides (b), vazamento de eletrólitos da folha (c) e das raízes (d) do tomateiro cultivado em solução nutritiva, com NO₃⁻ e NH₄⁺, e concentrações de Si. ns, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si pelo teste F. Max: ponto de máximo da regressão.

4.3.4 Altura de plantas, área foliar e massa seca da parte aérea e das raízes

Houve interação entre as formas de N e concentrações de Si para a altura de plantas (Figura 9a). Com o aumento das concentrações de Si, não houve alteração na altura das plantas nutridas com NH₄⁺. No entanto, a altura de plantas aumentou em função das concentrações de Si nas plantas com NO₃⁺, com diferença entre as formas de N nas concentrações de 2 e 2,5 mmol L⁻¹ de Si. A área foliar das plantas

com NO_3^- aumentou em função das concentrações de Si e não foi alterada nas plantas com NH_4^+ (Figura 9b).

Não houve interação para a massa seca da parte aérea e das raízes (Figuras 9c e 9d). Contudo, com NO_3^- , a massa seca da parte aérea foi maior e aumentou em função das concentrações de Si. Nas plantas com NH_4^+ , a massa seca da parte aérea aumentou até à concentração de $1,28 \text{ mmol L}^{-1}$ de Si. Houve aumento da massa seca das raízes com as concentrações de Si, de forma linear para as plantas com NO_3^- , e até $1,32 \text{ mmol L}^{-1}$ de Si nas plantas com NH_4^+ (Figura 9d).

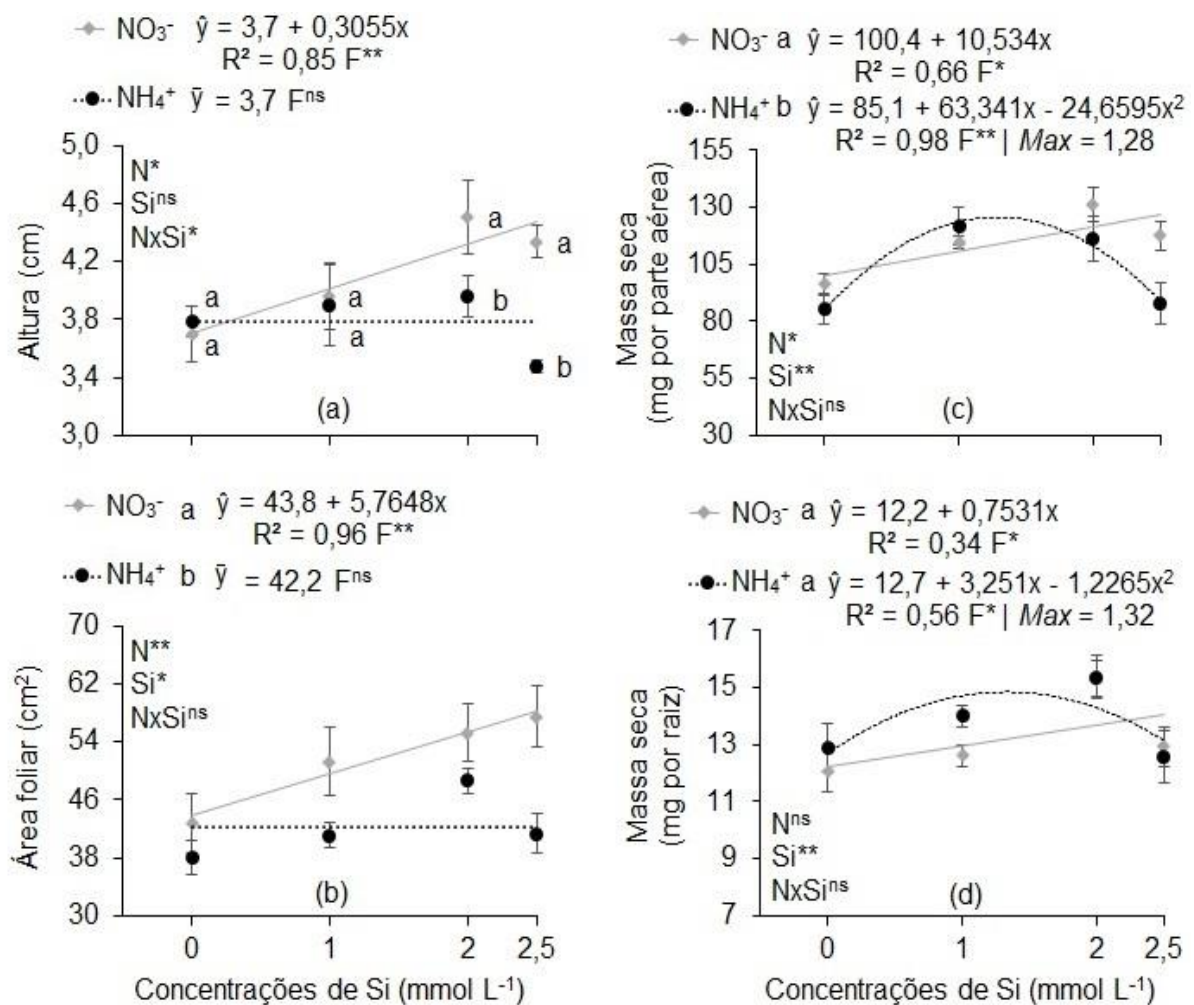


Figura 9. Altura (a), área foliar (b), massa seca da parte aérea (c) e das raízes (d) do tomateiro cultivado em solução nutritiva, com NO_3^- e NH_4^+ , e concentrações de Si. ns, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si pelo teste F; Max: ponto de máximo da regressão.

4.3.5 Plantas cultivadas em NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de Si

Nas plantas com NO_3^- , notou-se aumento do volume de folhas e de raízes com o aumento das concentrações de Si (Figura 10a), assim como folhas menos curvadas para baixo, em relação às plantas com NH_4^+ (Figura 10b). No entanto, a epinastia foi menos evidente na planta com NH_4^+ mais 2 mmol L^{-1} de Si. Nesse contexto, o Si melhorou o crescimento das plantas em NO_3^- e aliviou a toxicidade de NH_4^+ .

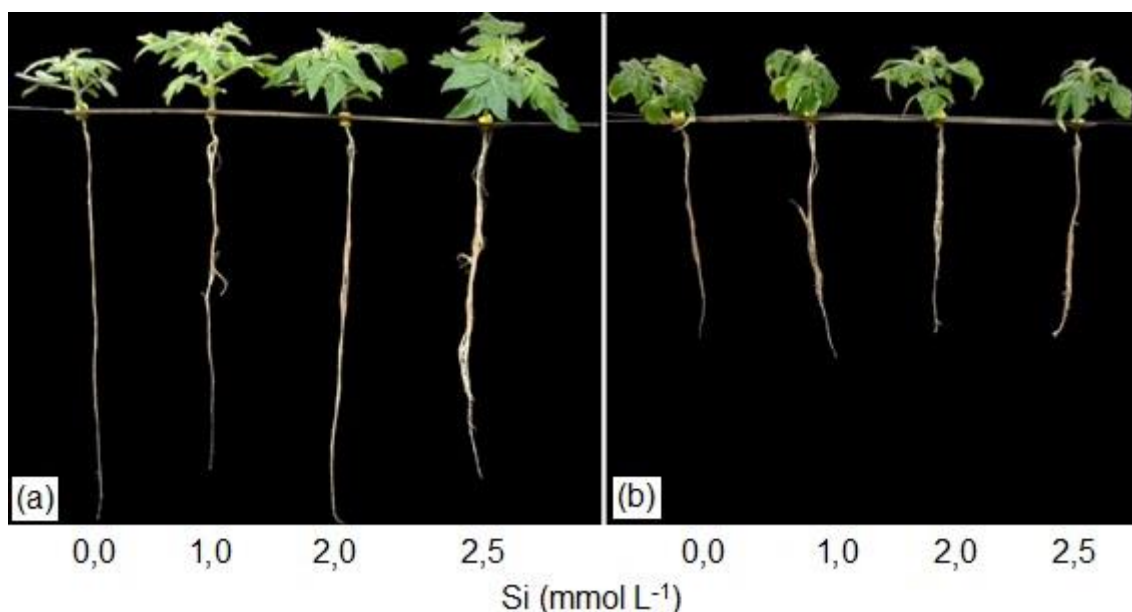


Figura 10. Tomateiro MT cultivado em solução nutritiva com concentrações de Si associadas a NO_3^- (a) e NH_4^+ (b).

O alívio da toxicidade de NH_4^+ com o Si, verificado principalmente pelo aumento da massa seca da parte aérea e das raízes (Figuras 9a e 9b), deve-se ao fato de que a planta acumulou o elemento benéfico (Figura 7d) e teve aumento do conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Figuras 8a e 8b).

De forma semelhante, as plantas com NO_3^- acumularam Si (Figura 7d). No entanto, sem diferença no teor e no acúmulo de N na parte aérea, em função do Si (Figuras 7a e 7b), houve aumento dos pigmentos fotossintéticos (Figuras 8a e 8b) e do crescimento das plantas (Figura 9), sendo indicativo de aumento da eficiência de uso do N com o Si, que é a capacidade de a planta converter o nutriente absorvido em massa seca (Siddiqi e Glass, 1981).

É importante destacar que não foi realizado experimento com concentrações de NO_3^- para definir a melhor concentração. Foi definida a concentração de NH_4^+ e utilizada a mesma na forma de NO_3^- como controle; porque, para ser considerada tolerante ao NH_4^+ , a planta precisa crescer igual àquela cultivada em NO_3^- (Cruz et al., 2006). Contudo, em condições semelhantes de cultivo, com 15 mmol L^{-1} de NO_3^- e $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ca^{2+} (Barreto et al., 2018), a massa seca da parte aérea foi cerca de 2,5 vezes maior que a observada no presente trabalho (Figura 9c), em que o experimento foi com $5,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de NO_3^- e $2,95 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ca^{2+} (Tabela 3). Dessa forma, é possível que as concentrações de N e de Ca tenham sido baixas no tratamento controle, e por isso o Si tenha aumentado o crescimento das plantas com NO_3^- .

Por fim, com a concentração de Si adequada para aliviar a toxicidade de NH_4^+ (Figuras 9c), foi possível estudar se esse benefício do Si é dependente do conteúdo de CKs. Para isso, foi desenvolvido experimento com $5,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de NO_3^- ou NH_4^+ , na ausência e na presença de Si ($1,29 \text{ mmol L}^{-1}$) no tomateiro MT e no *MT CKX2* (deficiente em CKs).

4.4 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e Si no tomateiro MT e no *MT CKX2*

4.4.1 Teor e acúmulo de Si no MT

Não houve interação entre as formas de N e de Si para o teor de N na parte aérea do MT (Figura 11a). Independentemente da forma de N, o teor de Si foi maior com o seu fornecimento via solução nutritiva.

Nas plantas com NO_3^- , não houve diferença no acúmulo de Si com o seu fornecimento via solução nutritiva. No entanto, nas plantas com NH_4^+ , o fornecimento de Si resultou no aumento da quantidade acumulada (Figura 11b).

O fato de não ter ocorrido aumento do acúmulo de Si nas plantas com NO_3^- pode ser explicado pela concentração do elemento benéfico que foi utilizada ($1,28 \text{ mmol L}^{-1}$), pois não foi identificada a concentração de maior acúmulo devido ao ajuste linear da equação para as plantas com NO_3^- (Figura 7d). Contudo, como a concentração de Si utilizada nas plantas com NH_4^+ foi próxima da que proporcionou maior acúmulo na parte aérea do tomateiro MT (Figura 7d), era esperado que o seu fornecimento resultasse em maior acúmulo, e foi confirmado (Figura 11b).

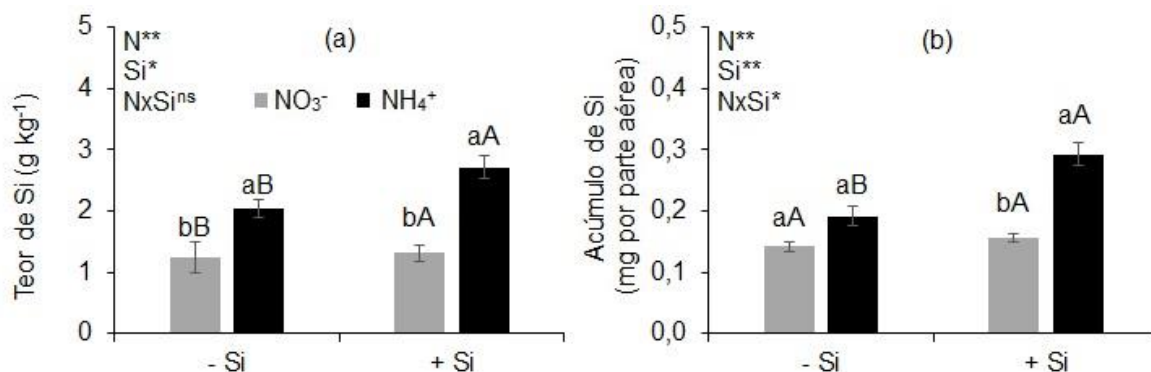


Figura 11. Teor (a) e acúmulo (b) de Si na parte aérea do tomateiro Micro-Tom cultivado em solução nutritiva, com NO₃⁻ e NH₄⁺, na presença e ausência de Si. ns, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

4.4.2 Teor e acúmulo de N no MT e no *MT CKX2*

As plantas de MT e *MT CKX2* cultivadas em NO₃⁻, na presença e na ausência de Si, tiveram valores semelhantes de teor de N na parte aérea (Figuras 12a e 12c). No entanto, em NH₄⁺, a presença de Si resultou em aumento do teor de N no MT. Contudo, no *MT CKX2*, o aumento no teor de N nas plantas com NH₄⁺ ocorreu de modo independentemente do Si e foi por volta de 50%. Esses resultados sugerem que a toxicidade de NH₄⁺ possa ser mais severa na planta deficiente em CKs, devido à maior concentração de N na parte aérea, quando nutridas com NH₄⁺.

O fato do *MT CKX2* ter exibido menor crescimento que o MT e mesmo teor de N na parte aérea, quando cultivado em NO₃⁻, além do aumento do teor de N em NH₄⁺, independentemente do Si, indica que, no transgênico, o N fica mais concentrado na parte aérea. Sobre esse aspecto, foi proposto que as CKs regulam negativamente a absorção de N, ou seja, que as CKs atuem como um sinal de saciedade do N para inibir a absorção de N pelas raízes (Kiba et al., 2011). Assim, a falta de CKs pode resultar em N mais concentrado no tecido das plantas.

No MT, o acúmulo de N foi menor apenas com NH₄⁺ na ausência de Si (Figura 12b). Porém, no *MT CKX2* cultivado em NH₄⁺, o acúmulo de N diminuiu na ausência e na presença de Si (Figura 12d).

4.4.3 Clorofila total e carotenoides no MT e no *MT CKX2*

As plantas de MT tiveram aumento do teor de clorofila total quando cultivadas em NH_4^+ na presença de Si (Figura 13a). No entanto, o teor de clorofila total foi menor nas plantas de *MT CKX2* cultivadas em NH_4^+ , independentemente do fornecimento de Si (Figura 13c). Não houve diferença nos carotenoides em função dos tratamentos, tanto no MT (Figura 13b), quanto no *MT CKX2* (Figura 13d).

É possível que as plantas transgênicas tenham exibido menor teor de clorofilas e carotenoides porque as CKs estimulam a formação dos cloroplastos e a biossíntese de clorofilas. Assim, plantas de tabaco deficientes em CKs tiveram menor teor de clorofila e cloroplastos desorganizados, sendo dilatados e com grana menor em relação ao tipo selvagem (Werner et al., 2008).

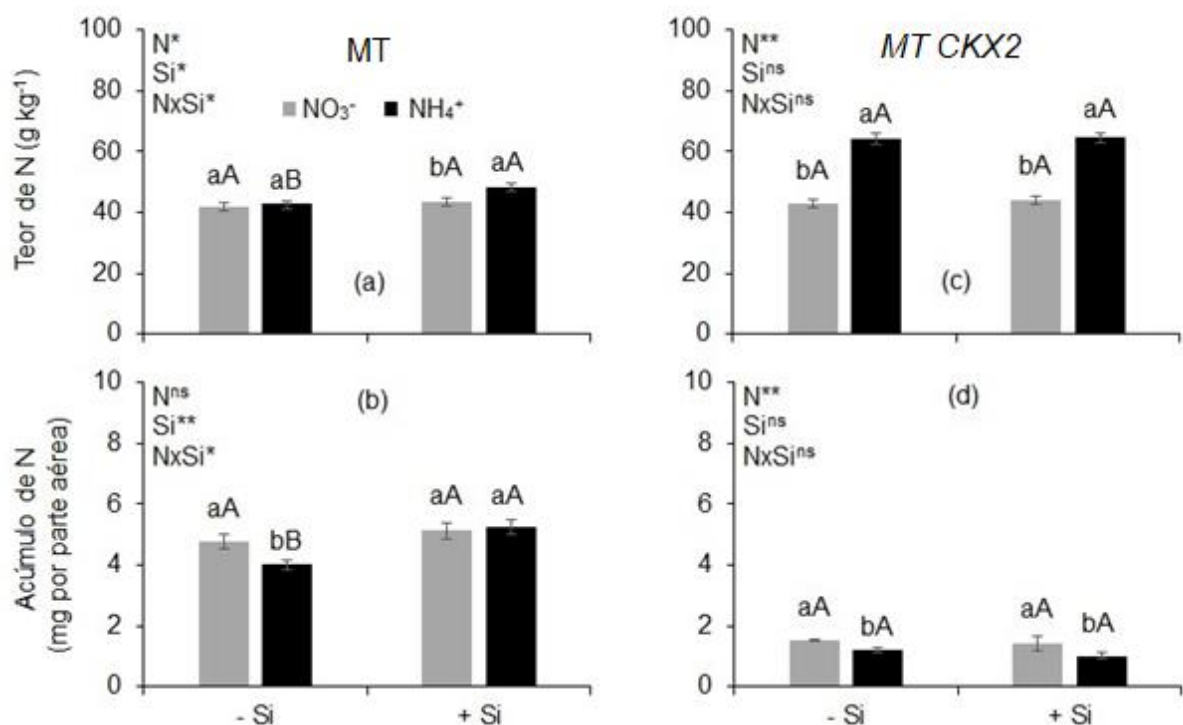


Figura 12. Teor (a) e acúmulo (b) de N na parte aérea do tomateiro Micro-Tom (MT), e teor (c) e acúmulo (d) de N na parte aérea do *MT CKX2* cultivados em solução nutritiva, com NO_3^- e NH_4^+ , na presença e ausência de Si. ^{ns}, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

4.4.4 Malondialdeído e H₂O₂ no MT e no MT CKX2

Nas folhas, houve diferentes padrões de resposta entre o MT e o MT CKX2 quanto ao teor dos indicadores de estresse. No MT, o teor de MDA foi maior nas plantas com NH₄⁺, independentemente do fornecimento de Si (Figura 14a). No MT CKX2, aconteceu o oposto, ou seja, as plantas cultivadas em NH₄⁺ tiveram menor teor de MDA (Figura 14c). Não houve diferença no teor de MDA nas raízes do MT e do MT CKX2 com os tratamentos (Figuras 14b e 14d). Com relação ao H₂O₂, o fornecimento de Si resultou em sua diminuição nas folhas do MT cultivado em NH₄⁺, quando comparado ao NO₃⁻ na presença de Si (Figura 15a). No entanto, o teor de H₂O₂ foi menor nas plantas cultivadas em NH₄⁺, independentemente do fornecimento de Si (Figura 15c). Nas raízes das plantas de MT cultivadas em NH₄⁺, o teor de H₂O₂ diminuiu com o fornecimento de Si (Figura 15b), o que não foi observado nas raízes do MT CKX2 (Figura 15d).

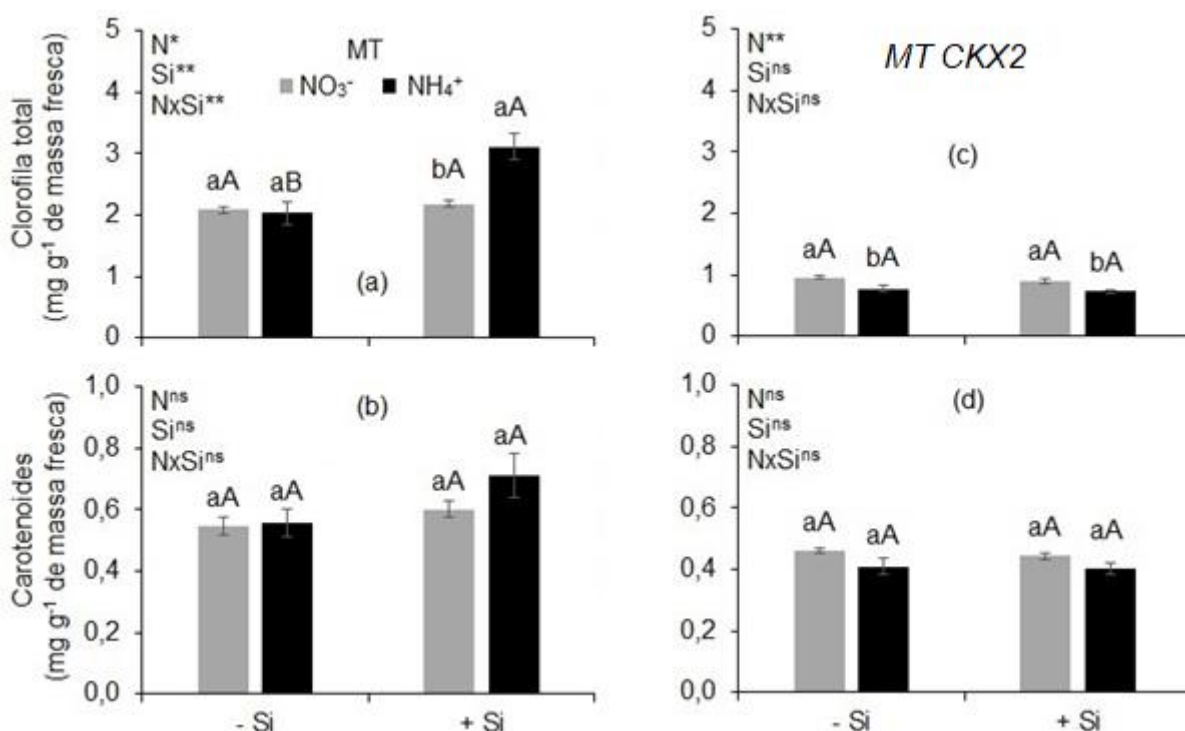


Figura 13. Clorofila total (a) e carotenoides (b) no tomateiro Micro-Tom (MT), e clorofila total (c) e carotenoides (d) no MT CKX2 cultivados em solução nutritiva, com NO₃⁻ e NH₄⁺, na presença e ausência de Si. ^{ns}, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

Uma vez que as CKs atuam no combate as espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 (Zavaleta-Mancera et al., 2007), esperava-se que o *MT CKX2* exibisse maiores teores de H_2O_2 , o que não aconteceu, possivelmente, porque a diminuição de CKs e aumento de H_2O_2 foi correlacionada apenas com estresses que provoquem clorose nas folhas do tomateiro (Cueno et al., 2012).

4.4.1 Altura de plantas, área foliar, massa seca da parte aérea e da raiz no MT e no *MT CKX2*

As plantas de MT e de *MT CKX2* tiveram menor altura quando cultivadas em NH_4^+ , independentemente da aplicação de Si na solução nutritiva (Figuras 16a e 16c). No entanto, com relação à área foliar, os padrões de resposta foram diferentes entre o MT e o *MT CKX2*. No MT cultivado em NH_4^+ , com o fornecimento de Si, houve aumento da área foliar (Figura 16b), o que não aconteceu no *MT CKX2* (Figura 16d). Nesse contexto, os resultados indicam que o Si tenha amenizado a toxicidade de NH_4^+ apenas no MT.

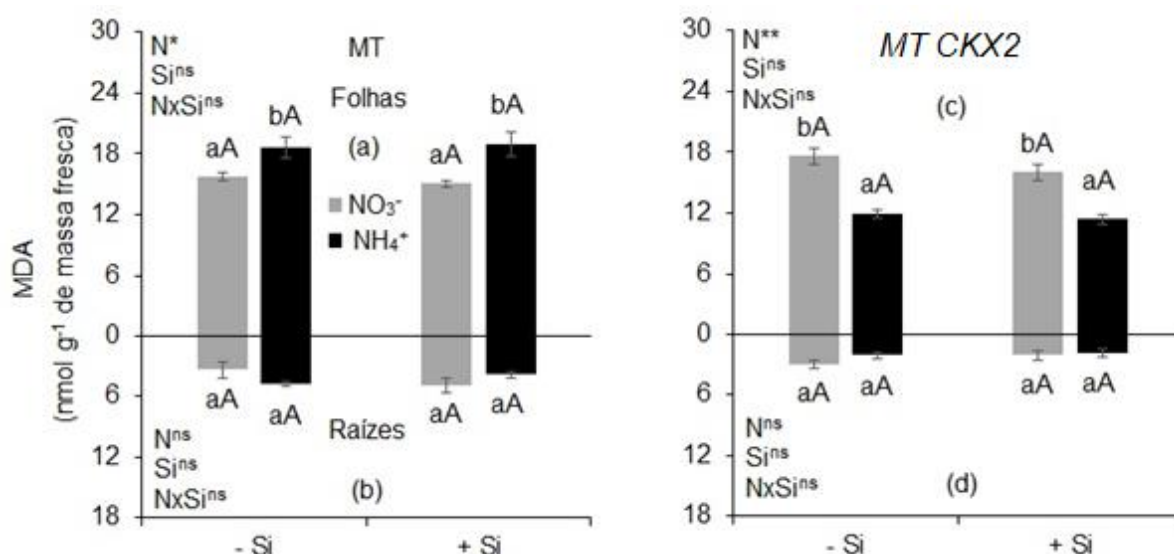


Figura 14. Teor de MDA nas folhas (a) e nas raízes (b) do tomateiro Micro-Tom (MT), e nas folhas (c) e nas raízes (d) no *MT CKX2* cultivados em solução nutritiva, com NO_3^- e NH_4^+ , na presença e ausência de Si. ns, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

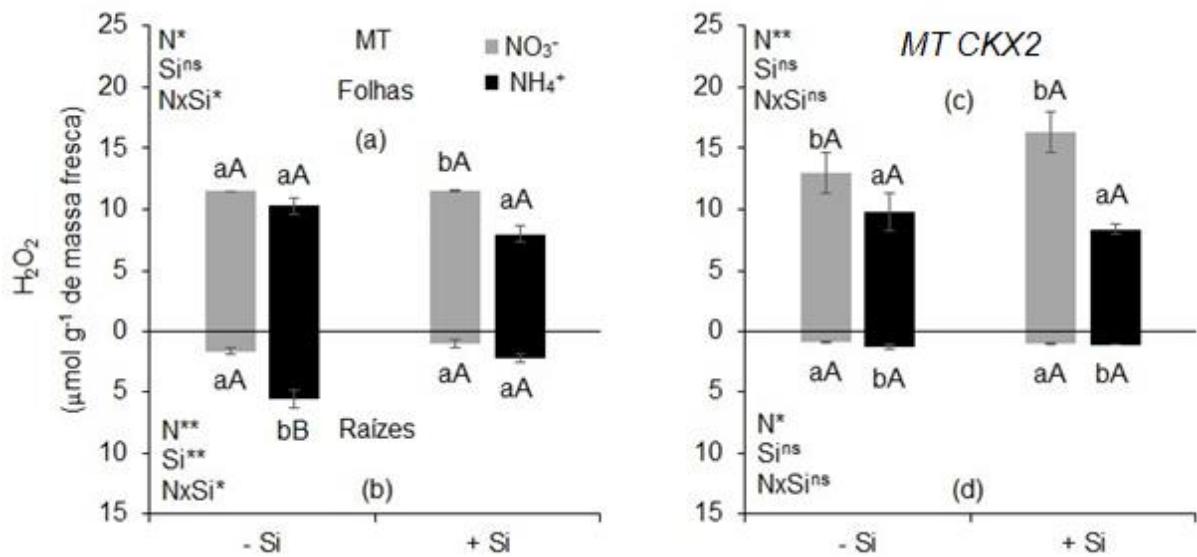


Figura 15. Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas (a) e nas raízes (b) do tomateiro Micro-Tom (MT), e nas folhas (c) e nas raízes (d) no *MT CKX2* cultivados em solução nutritiva, com NO_3^- e NH_4^+ , na presença e ausência de Si. ^{ns}, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

O fenótipo do *MT CKX2*, com estágio de desenvolvimento atrasado, menor altura e com folhas estreitas, ocorreu porque a falta de CKs provoca a menor divisão celular do meristema apical da parte aérea, bem como, leva a diminuição da taxa de divisão celular das folhas e/ou causa o término precoce da divisão celular (Werner et al., 2003).

Na ausência de Si, o MT cultivado em NH_4^+ teve menor massa seca da parte aérea (Figura 17a) e das raízes (Figura 17b), em relação às plantas com NO_3^- . Porém, na presença de Si, a massa seca da parte aérea e das raízes das plantas cultivadas em NH_4^+ não diferiu das plantas em NO_3^- . Ou seja, o Si aliviou a toxicidade de NH_4^+ no tomateiro MT, o que não foi observado no *MT CKX2*, pois a massa seca da parte aérea e das raízes foi menor nas plantas cultivadas em NH_4^+ , independentemente da aplicação de Si na solução nutritiva (Figuras 17c e 17d).

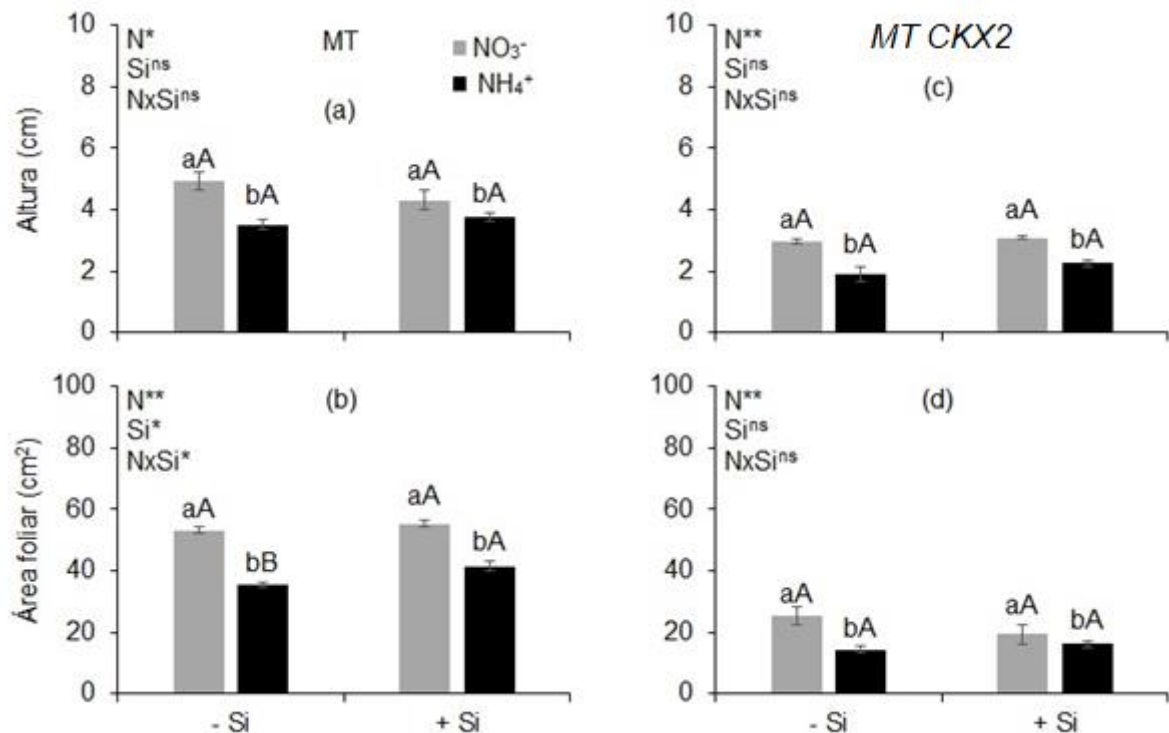


Figura 16. Altura (a) e área foliar (b) do tomateiro Micro-Tom (MT), e altura (c) e área foliar (d) do *MT CKX2* cultivados em solução nutritiva, com NO_3^- e NH_4^+ , na presença e ausência de Si. ^{ns}, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

4.4.2 Plantas de MT e de *MT CKX2*

Nas plantas de MT, nota-se que, nos tratamentos com NO_3^- e NO_3^- mais Si, as plantas ficaram semelhantes. No entanto, com NH_4^+ , a planta teve menor crescimento; e com NH_4^+ mais Si, a planta ficou maior em relação ao tratamento com NH_4^+ (Figura 18a). De modo diferente, na foto do *MT CKX2*, não se nota diferença do crescimento das plantas com NH_4^+ e NH_4^+ mais Si. Além disso, de forma geral, o *MT CKX2* tem menor altura, folhas menores e mais estreitas que as do MT (Figura 18b).

Nesse contexto, existe a evidência de que o alívio da toxicidade de NH_4^+ pelo Si seja dependente do conteúdo de CKs, ou que o *MT CKX2* não tenha acumulado Si.

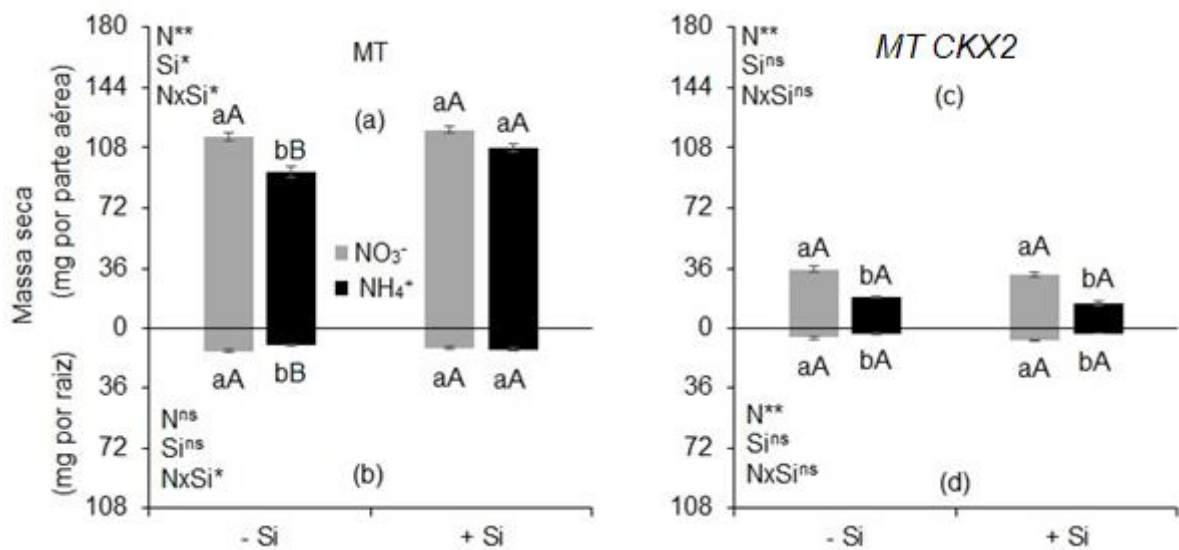


Figura 17. Massa seca da parte aérea (a) e da raiz (b) do tomateiro Micro-Tom (MT), e massa seca da parte aérea (c) e da raiz (d) do *MT CKX2* cultivados em solução nutritiva, com NO_3^- e NH_4^+ , na presença e ausência de Si. ^{ns}, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

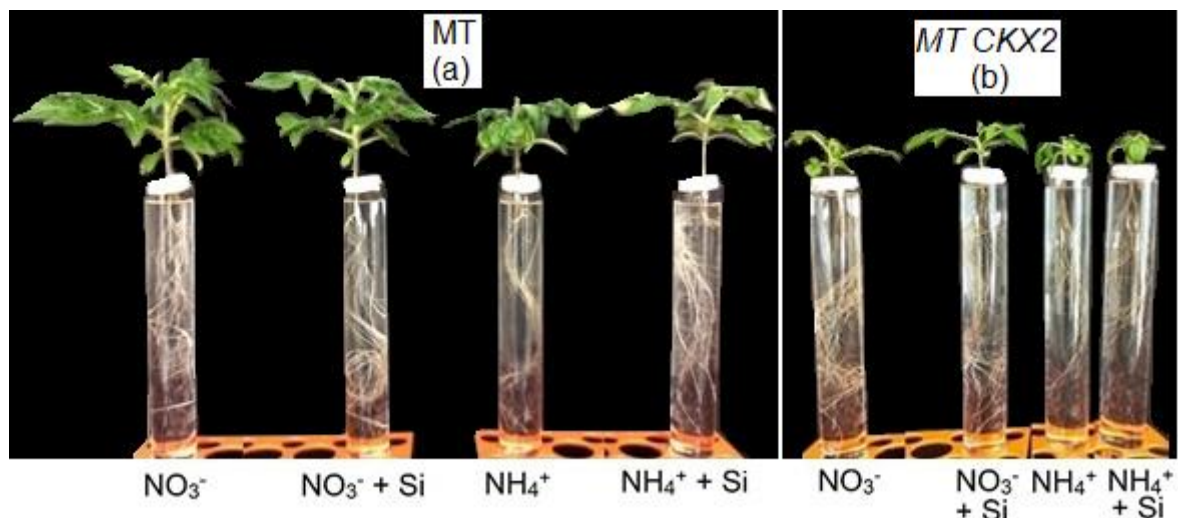


Figura 18. Tomateiro Micro-Tom (MT) (a) e *MT CKX2* (b) cultivados em solução nutritiva com NO_3^- ou NH_4^+ , na presença e na ausência de Si.

4.4.3 Quantificação de CKs no MT

As plantas cultivadas em NO_3^- , na ausência e na presença de Si, tiveram menor teor de *tZ* na parte aérea, em relação às plantas em NH_4^+ . No entanto, na presença de Si, o teor de *tZ* aumentou nas plantas cultivadas em NO_3^- e NH_4^+ (Figura 19a). Nas

raízes, aconteceu o oposto da parte aérea, ou seja, na ausência e na presença de Si, o teor de tZ foi maior nas plantas com NO_3^- . Porém, na presença de Si, o teor de tZ diminuiu nas plantas com NO_3^- e com NH_4^+ (Figura 19b).

No cultivo das plantas sem a adição de Si na solução nutritiva, o teor de iP na parte aérea e nas raízes foi menor naquelas em NH_4^+ . Com Si, não houve diferença do teor de iP da parte aérea com NO_3^- e NH_4^+ ; e nas raízes, as plantas em NH_4^+ tiveram menor teor de iP (Figuras 19c e 19d).

Assim, a hipótese de que o alívio da toxicidade de NH_4^+ pelo Si dependeria do aumento do teor de CKs pode ser aceita; porém, apenas para a tZ . Além disso, como as plantas com Si tiveram diminuição do teor de tZ nas raízes e aumento na parte aérea, é possível que o Si tenha atuado no transporte de tZ da raiz para a parte aérea, além do possível estímulo à biossíntese de CKs na parte aérea (Markovich et al., 2017).

As alterações na concentração de CKs em plantas foram atribuídas, principalmente, à maior ou à menor síntese de CKs nas raízes (Rahayu et al., 2005), à ação da citocinina oxidase (Brugiere et al., 2003) e ao mecanismo de controle do carregamento de CKs no xilema, que é o transporte transmembrana de CKs pelas células da raiz, mediado pela purina permease e por proteínas de transporte de nucleosídeos, que integram a membrana lipídica (Hirose et al., 2008). Contudo, não foram encontradas pesquisas sobre o papel do Si sobre os transportadores de CKs.

4.5 Experimento com NO_3^- , NH_4^+ e concentrações de BA associadas ao NH_4^+

As plantas cultivadas em NO_3^- tiveram maior altura, área foliar e massa seca da parte aérea em relação às plantas cultivadas em NH_4^+ ; e com o fornecimento de BA na solução nutritiva, não houve diferença nesses parâmetros, até à concentração de $1e^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para a altura e para a área foliar (Figuras 20a e 20b). Contudo, com as concentrações de $1e^{-7}$ e $1e^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, houve diminuição da altura de plantas, da área foliar e da massa seca da parte aérea (Figura 20c). Ou seja, as duas maiores concentrações foram tóxicas.

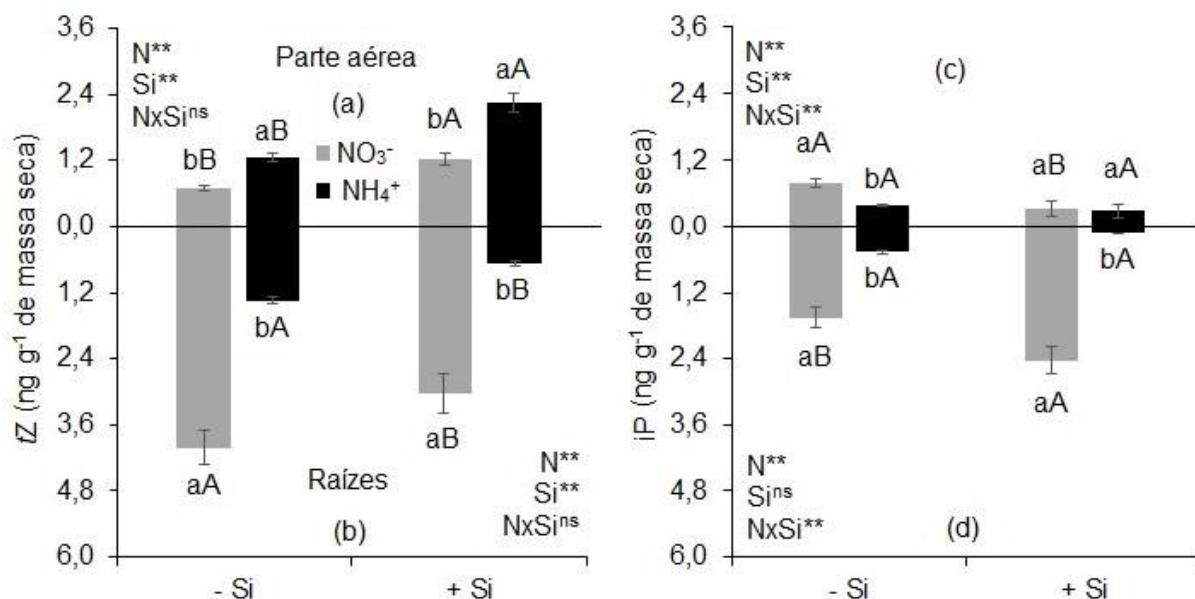


Figura 19. Teor de *trans*-zeatina (*tZ*) na parte aérea (a) e nas raízes (b), e teor de isopenteniladenina (*iP*) na parte aérea (c) e nas raízes (d) do tomateiro Micro-Tom cultivado em solução nutritiva, com NO₃⁻ e NH₄⁺, na presença e ausência de Si. ^{ns}, * e **: não significativo, significativo a 5 e 1%, respectivamente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença entre as formas de N na mesma condição de Si. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença na mesma forma de N, entre as condições de Si.

No entanto, a área (Figura 20e) e a massa seca das raízes (Figura 20f) aumentaram com as concentrações de BA, entre $1e^{-10}$ e $1e^{-8}$ mol L⁻¹, sugerindo que a concentração benéfica desse hormônio para as raízes não seja a mesma para a parte aérea, ou que não tenha benefícios para a parte aérea. Nesse contexto, o fornecimento de *tZ* ao meio de cultivo resultou no alívio da toxicidade de NH₄⁺ em plantas de *A. thaliana* (Shtratnikova et al., 2015), indicando que as formas de CK de ocorrência natural nas plantas possam ser mais eficientes para aliviar a toxicidade de NH₄⁺ no tomateiro.

Nota-se, na Figura 21, que houve menor crescimento das plantas com o NH₄⁺ na solução nutritiva, que as raízes das plantas cultivadas em NH₄⁺ associado às concentrações de $1e^{-9}$ e $1e^{-8}$ mol L⁻¹ de BA tiveram maior crescimento, e que as plantas não se desenvolveram com as concentrações de $1e^{-7}$ e $1e^{-6}$ mol L⁻¹.

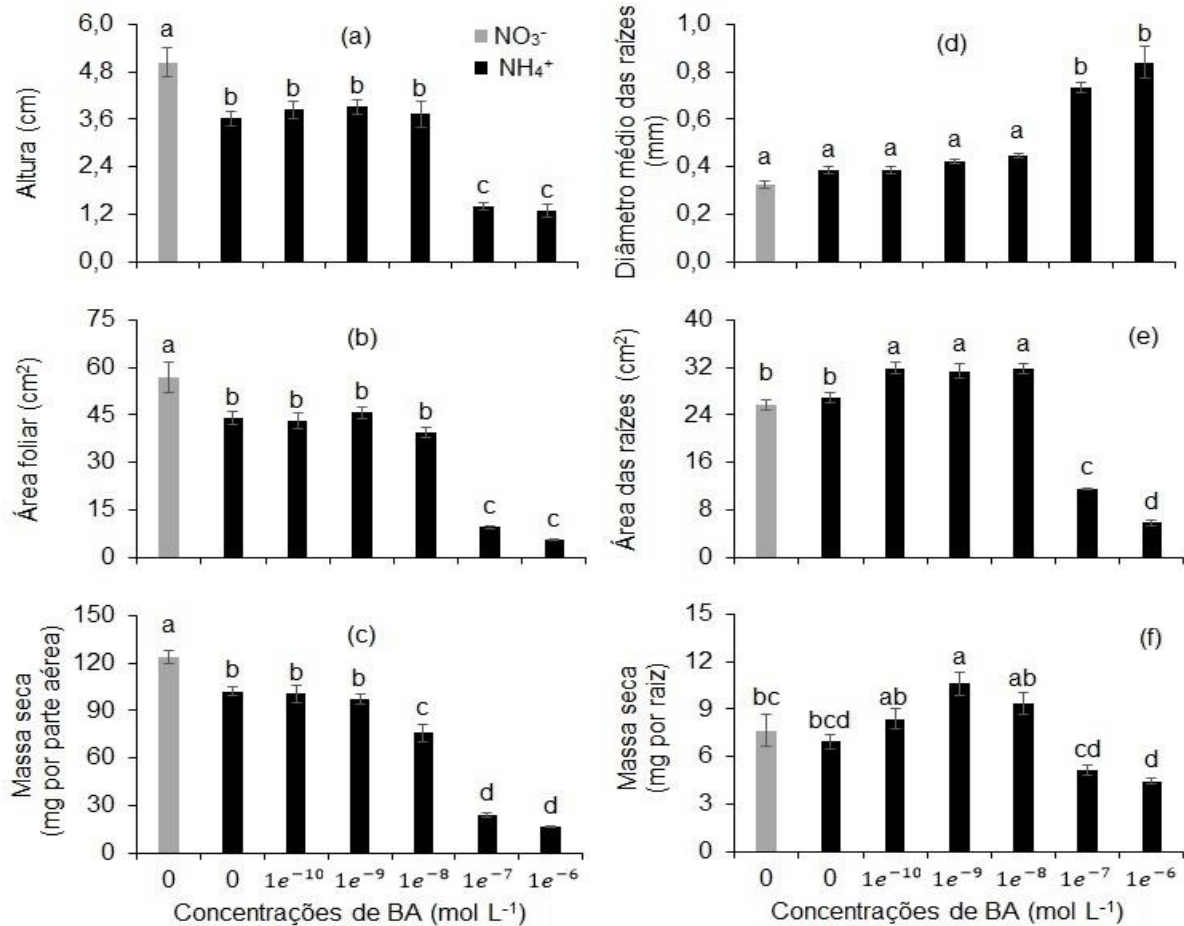


Figura 20. Altura (a), área foliar (b) massa seca da parte aérea (c), diâmetro médio das raízes (d), área das raízes (e) e massa seca da raiz (f) do tomateiro Micro-Tom cultivado em solução com NO₃⁻ e NH₄⁺ associado a concentrações de 6-benziladenina (BA). Letras iguais indicam que não houve diferença pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

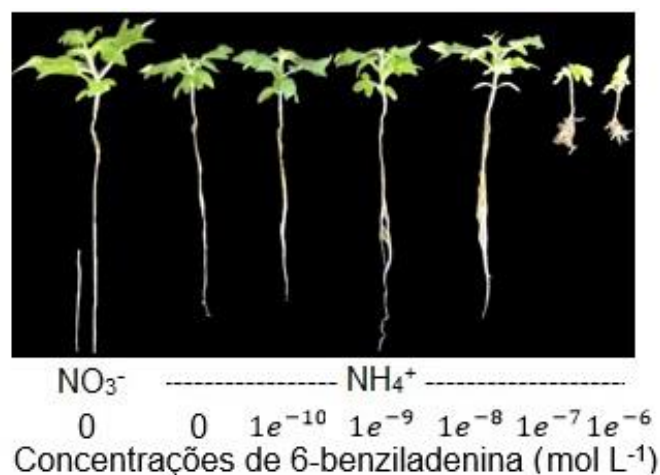


Figura 21. Tomateiro Micro-Tom cultivado em solução com NO₃⁻ e NH₄⁺ associado a concentrações de 6-benziladenina.

5 CONCLUSÕES

O alívio da toxicidade de NH_4^+ com uso do Si foi dependente do aumento do conteúdo da CK *trans*-zeatina (*tZ*) na parte aérea, mas não da isopenteniladenina (*iP*). No transgênico *MT CKX2* (com menor teor de CKs), o Si não aliviou a toxicidade de NH_4^+ , e a CK sintética BA não aliviou a toxicidade de NH_4^+ na parte aérea do tomateiro MT.

6 REFERÊNCIAS

- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment** 24:1337-1344.
- Ariz I, Artola E, Asensio AC, Cruchaga S, Aparicio-Tejo PM, Moran JF (2011) High irradiance increases NH_4^+ tolerance in *Pisum sativum*: Higher carbon and energy availability improve ion balance but not N assimilation. **Journal of Plant Physiology** 10:1009-1015.
- Arruda Junior SJ, Bezerra Neto E, Barreto LP, Resende LV (2011) Blossom-end rot and productivity of tomatoes as a function of calcium and ammonium contents. **Revista Caatinga** 24:20-26.
- Balkos KD, Britto DT, Kronzucker HJ (2010) Optimization of ammonium acquisition and metabolism by potassium in rice (*Oryza sativa* L. cv. IR-72). **Plant, Cell and Environment** 33:23-34.
- Bamsey MT, Berinstain A, Dixon MA (2014) Calcium-selective optodes for the management of plant nutrient solutions. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 190:61-69.
- Baohai L, Guangjie L, Kronzucker HJ, Baluška F, Shi W (2014) Ammonium stress in *Arabidopsis*: signaling, genetic loci, and physiological targets. **Trends in Plant Science** 19:107-114.
- Barker AV, Corey KA (1991) Interrelations of ammonium toxicity and ethylene action in tomato. **HortScience** 26:177-180.
- Barreto RF, Cruz FJR, Gaion LA, Prado RM, Carvalho RF (2018) Accompanying ions of ammonium sources and nitrate: ammonium ratios in tomato plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science** 181:382-387.
- Barreto RF, Prado RM, Leal AJF, Troleis MJB, Silva Junior GB, Monteiro CC, Santos LCN, Carvalho RF (2016) Mitigation of ammonium toxicity by silicon in tomato depends

on the ammonium concentration. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil and Plant Science** 66:483-488.

Barreto RF, Schiavon Júnior AA, Maggio MA, Prado RM (2017) Silicon alleviates ammonium toxicity in cauliflower and in broccoli. **Scientia Horticulturae** 225:743-750.

Bataglia OC, Furlani AMC, Teixeira JAF, Furlani PR, Gallo JR (1983) **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agrônômico: IAC, 31 p. (Circular, 87).

Bittsánszky A, Pilinszky K, Gyulai G, Komives (2015) Overcoming ammonium toxicity. **Plant Science** 231:184-180

Borgognone D, Colla G, Rouphael Y, Cardarelli M, Reac E, Schwarz D (2013) Effect of nitrogen form and nutrient solution pH on growth and mineral composition of self-grafted and grafted tomatoes. **Scientia Horticulturae** 149:61-69.

Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology** 159:567-584.

Brugiere N, Jiao SP, Hantke S, Zinselmeier C, Roessler JA, Niu XM, Jones RJ, Habben JE (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. **Plant Physiology** 132:1228-1240.

Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsögön A, Lima JE, Benedito VA, Peres L (2011) Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant methods** 7:1-14.

Cooper AJ (1974) Crop production in nutrient film. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 25:339-339.

Crusciol CAC, Soratto RP, Castro GSA, Costa CHM, Ferrari Neto J (2013) Aplicação foliar de ácido silícico estabilizado na soja, feijão e amendoim. **Revista Ciência Agrônômica** 44:404–410.

Cruz C, Bio AFM, Domínguez-Valdivia MD, Aparicio-Tejo PM, Lamsfus C, Martins-Loução MA (2006) How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium?. **Planta** 223:1068-1080.

Cueno ME, Imai K, Ochiai K, Okamoto T (2012) Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. **Journal of Plant Physiology** 169:834-838.

Darwin C (1882) The action of carbonate of ammonia on the roots of certain plants. **Botanical Journal of the Linnean Society** 19:239-261.

Davis RD, Beckett PHT, Wollan E (1978) Critical levels of twenty potentially toxic elements in young spring barley. **Plant and Soil** 49:395-408.

Dionisio-Sese ML, Tobita S (1998) Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science** 35:1-9.

Epstein E (1999) Silicon. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology** 50:641-664.

Esteban R, Ariz I, Cruz C, Moran JF (2016) Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. **Plant Science** 248:92-101.

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1039-1042.

Gao Q, Wang Y, Lu X (2014) Effects of exogenous silicon on physiological characteristics of cucumber seedlings under ammonium stress. **Journal of Applied Ecology** 25:1395-1400.

Ginzberg I, Stern R (2016) Strengthening fruit-skin resistance to growth strain by application of plant growth regulators. **Scientia Horticulturae** 198:150-153.

Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. **Trends in Plant Science** 17:172-179.

Harrison CC, Loton N (1995) Novel routes to designer silicas: studies of the decomposition of $(M^+)_2[Si(C_6H_4O_2)_3].H_2O$. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions** 91:4287-4297.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics** 125:189-198.

Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization, and translocation. **Journal of Experimental Botany** 59:75-83.

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular** 347:1-32.

Horchani F, Hajri R, Aschi-Smit S (2011) Is the sensitivity to ammonium nutrition related to nitrogen accumulation?. **Current Botany** 2:18-22.

Jiang K, Asami T (2018) Chemical regulators of plant hormones and their applications in basic research and agriculture. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 82:1265-1300.

Kiba T, Kudo T, Kojima M, Sakakibara H (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. **Journal of Experimental Botany** 62:1399-1409.

Kleiber T, Calomme M, Borowiak K (2015) The effect of choline-stabilized orthosilicic acid on microelements and silicon concentration, photosynthesis activity and yield of tomato grown under Mn stress. **Plant Physiology and Biochemistry** 96:180-188.

Korndörfer GH, Pereira HS, Nola A (2004) **Análise de silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia: Instituto de Ciências Agrárias: UFU, 34 p. (Boletim Técnico, 2).

Lanquar V, Frommer WB (2010) Adjusting ammonium uptake via phosphorylation. **Plant Signaling and Behavior** 5:736-738.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148:350-382.

Liu G, Du Q, Li J (2017) Interactive effects of nitrate-ammonium ratios and temperatures on growth, photosynthesis, and nitrogen metabolism of tomato seedlings. **Scientia Horticulturae** 5:41-50.

Liu J, Zhang H, Zhang Y, Chai T (2013) Silicon attenuates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. by reducing cadmium uptake and oxidative stress. **Plant Physiology and Biochemistry** 68:1-7.

Ma JF, Takahashi E (2002) **Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan**. Amsterdam: Elsevier Science. 295p.

Markovich O, Steiner E, Kouřil Š, Tarkowski P, Aharoni A, Elbaum R (2017) Silicon promotes cytokinin biosynthesis and delays senescence in arabidopsis and sorghum. **Plant, Cell and Environment** 40:1189-1196.

Marouani A, Behi O, Salah HB, Quilez OA (2015) Establishment of Chlorophyll Meter Measurements to Manage Crop Nitrogen Status in Potato Crop. **Communications in soil science and plant analysis** 46:476-489.

Martínez HEP (2016) **Manual práctico de hidroponia**. Viçosa: Aprenda fácil, 286p.

McKeague JA, Cline MG (1963). Silica in the soil. **Advances in Agronomy** 15:339-396.

Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuy S, Shalev G. Ashri A, Elkind Y, Levy A (1997) A new model system for tomato genetics. **Plant Journal** 12:1465-1472.

Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007) Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany** 58:2297-2306.

Miller CO, Skoog F, Okomura FS, Von Saltza MH Strong FM (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. **Journal of the American Chemical Society** 78:1375-1380.

Mitani N, Ma JF (2005) Uptake system of silicon in different plant species. **Journal of Experimental Botany** 56:1255-1261.

Miyake Y, Takahashi E (1978) Silicon deficiency of tomato plant. **Soil Science and Plant Nutrition** 24:175-189.

Pino-Nunes LE (2009) **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom)**. 141 f. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – CENA, Piracicaba.

Prado RM, Barreto RF, Felisberto G (2017) Nitrate-ammonium ratios and silicon used in hydroponics In: Webster DJ (Ed.) **Advances in Hydroponics Research**. Nova York: Nova Science Publishers, p. 33–55.

Prado RM, Felisberto G, Barreto RF (2018) Nova abordagem do silício na mitigação de estresses por deficiência de nutrientes In: Prado, RM, Campos, CNS (Eds.) **Nutrição e adubação de grandes culturas**. Jaboticabal: FUNEP/FCAV, p. 17–26.

Prado RM, Santos VHG, Gondim ARO, Alves AU, Cecílio Filho AB, Correia MAR (2011) Growth and nutrient absorption by Raisa tomato cultivar grown in hydroponic system. **Semina: Ciências Agrárias** 32:19-30.

Rahayu YS, Walch-Liu P, Neumann L, Römheld V, von Wirén N, Bangerth F (2005) Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO_3^- induced stimulation of leaf growth. **Journal of Experimental Botany** 56:1143-1152.

Salsac L, Chaillou S, Morot-Gaudry JF, Lesaint C, Jolivet E (1987) Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 25: 805-812.

Santschi PH, Schindler PW (1974) Complex formation in the ternary systems Ca^{II} – H_4SiO_4 – H_2O and Mg^{II} – H_4SiO_4 – H_2O . **Journal of the Chemical Society Dalton Transactions** 2:181-184.

Savvas D, Ntatsi G (2015) Biostimulant activity of silicon in horticulture. **Scientia Horticulturae** 196:66-81.

Seo M, Jikumaru Y, Kamiya Y (2011) Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies. **Methods in Molecular Biology** 773:99-111.

Shtratnikova VY, Kudryakova NV, Kudoyarova GR, Korobova AV, Akhiyarova GR, Danilova MN, Kusnetsov VV, Kulaeva ON (2015) Effects of nitrate and ammonium on growth of *Arabidopsis thaliana* plants transformed with the *ARR5::GUS* construct and

a role for cytokinins in suppression of disturbances induced by the presence of ammonium. **Russian Journal of Plant Physiology** 62:741-752.

Siddiqi MY, Glass ADM (1981) Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition** 4:289-302.

Ten Hoopen F, Cuin TA, Pedas P, Hegelund JN, Shabala S, Schjoerring JK, Jahn TP (2010) Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and *Arabidopsis* roots: molecular mechanisms and physiological consequences. **Journal of Experimental Botany** 61:2303-2315.

Tréguer P, Nelson DM, Van Bennekom AJ, DeMaster DJ, Leynaert A, Queguiner B (1995) The silica balance in the world ocean: a reestimate. **Science** 268:375-379.

Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC (2012) Nutrient solutions for hydroponic systems. In.: Asao T (Ed.) **Hydroponics - a standard methodology for plant biological researches**. Rijeka: InTech, p. 1-22.

Vega-Mas I, Marino D, Sánchez-Zabala J, González-Murua C, Estavillo JM, González-Moro MB (2015). CO₂ enrichment modulates ammonium nutrition in tomato adjusting carbon and nitrogen metabolism to stomatal conductance. **Plant Science** 241:32-44.

Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C (2000) Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. **Journal of Experimental Botany** 51:227-237.

Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 98:10487-10492.

Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **The Plant Cell** 15:2532–2550.

Werner T, Holst K, Pörs Y, Guivarc'h A, Mustroph A, Chriqui D, Grimm B, Schmülling T (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. **Journal of Experimental Botany** 59:2659–2672.

Wu X, He J, Chen J, Yang S, Zha D (2014) Alleviation of exogenous 6-benzyladenine on two genotypes of eggplant (*Solanum melongena* Mill.) growth under salt stress. **Protoplasma** 251:169-176.

Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado H, Loza-Tavera, Mora-Herrera, Trevilla-García C, Vargas-Suárez, Ougham H (2007) Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. **Journal of plant physiology** 164:1572-1582.