

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

**ALEXCYANE RODRIGUES FEIJÃO**

**CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS, PARTIÇÃO DE ÍONS E METABOLISMO  
DO NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS À SALINIDADE E  
DIFERENTES FONTES DE N**

**FORTALEZA**

**2009**

**ALEXCYANE RODRIGUES FEIJÃO**

**CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS, PARTIÇÃO DE ÍONS E METABOLISMO  
DO NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS À SALINIDADE E  
DIFERENTES FONTES DE N**

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

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: *Prof. Dr. Enéas Gomes Filho*

Co-orientador: *Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda*

**FORTALEZA**

**2009**

F328c Feijão, Alexcyane Rodrigues

Crescimento, trocas gasosas, partição de íons e metabolismo do nitrogênio em plantas de milho submetidas à salinidade e diferentes fontes de N / Alexcyane Rodrigues Feijão, 2009.

111 f. ;il. enc.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2009.

1. Fontes de Nitrogênio 2. Metabolismo do N 3. Salinidade 4. *Zea mays*  
I. Gomes Filho, Enéas (orient.) II. Lacerda, Claudivan, Feitosa de (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Bioquímica  
IV. Título

CDD 574.192

**ALEXCYANE RODRIGUES FEIJÃO**

**CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS, PARTIÇÃO DE ÍONS E METABOLISMO  
DO NITROGÊNIO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS À SALINIDADE E  
DIFERENTES FONTES DE N**

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

**Aprovada em:** 26 de fevereiro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRBA

**FORTALEZA**

**2009**

**Aos meus pais Feijão e Socorro  
e a minha avó Maria Martha (*in memoriam*)**

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Ao professor Claudivan Feitosa de Lacerda por ter aceito ser meu co-orientador, estando sempre presente e mostrando-se paciente e atencioso.

Ao professor André Dias de Azevedo Neto, por ter participado de minha banca examinadora, pelas valiosas sugestões ao presente estudo, e pela amizade, incentivo e apoio.

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

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

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

Ao meu namorado Elton, que tanto me ajudou, me deu forças, alento e por me amar, escutar, ter paciência e estar sempre ao meu lado. Graças a sua presença foi mais fácil superar os dias de desânimo e cansaço.

A todos os meus amigos pela ajuda, apoio, companheirismo, amizade e momentos de alegria e de descontração.

Ao Julio César, meu companheiro de trabalho, pela sua ajuda ao longo desta caminhada.

Aos meus amigos e colegas componentes do grupo de Fisiologia Vegetal: Prof. Dr. Joaquim Enéas Filho, Dr. Marlos Alves Bezerra, Dr. Francisco Valderez, Aiala Amorim, Alexandre Bosco, Carlos Eduardo, Wesley Filho, Franklin Aragão, Juan Carlos, Michella Albuquerque, Michelle Andrade, Nara Lídia, Paulo André, Thalita Montoril, Valdinéia Soares e Viviane Oliveira, pelo auxílio nos experimentos, amizade, apoio e por tornarem meus dias no laboratório mais agradáveis.

Aos amigos e colegas do curso de mestrado em Bioquímica, ingresso 2007.1, especialmente Jefferson Soares de Oliveira e Eliane Silva Araújo, que comigo compartilharam diversos momentos, entre os quais, a alegria de sermos aprovados na seleção para o Doutorado em Bioquímica;

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

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

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da fonte de N no crescimento, nas trocas gasosas, na partição de íons e no metabolismo do N em plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas à salinidade. Para isto, sementes de milho foram semeadas em copos plásticos contendo vermiculita, sendo mantidas em casa de vegetação. Em seguida, as plântulas foram transferidas para um meio hidropônico com concentração de N igual a 6 mM, nas formas de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NH}_4^+$ . Após cinco dias nestas condições, iniciou-se a adição de NaCl, que foi feita em parcelas de 25 mM por dia, até atingir a concentração final de 100 mM. As coletas foram realizadas aos 4, 11 e 18 dias após o início do tratamento salino. Em condições controle, as plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  foram as que apresentaram o maior crescimento da parte aérea, em comparação aos demais tratamentos de N. Houve uma forte redução do crescimento quando as plantas foram submetidas à salinidade, mas este efeito foi independente da fonte de N empregada. De maneira geral, a salinidade reduziu a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ), a fotossíntese ( $A$ ) e a relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_o$ ) das plantas de todos os tratamentos de N e nos diferentes tempos de coleta. Entretanto, nas plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  e aos 18 dias do tratamento salino, foram observados uma redução acentuada na  $g_s$ ,  $A$  e  $E$  e um aumento na relação  $C_i/C_o$ . Os teores de  $\text{Na}^+$  aumentaram com a salinidade, contudo, nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , esses teores foram menores do que os dos demais tratamentos de N em condições de salinidade. Os teores de  $\text{K}^+$ , por sua vez, foram reduzidos pela salinidade, sendo que as plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e apenas  $\text{NH}_4^+$  absorveram menos  $\text{K}^+$  do que as cultivadas apenas com  $\text{NO}_3^-$ , principalmente nas folhas e colmos das plantas aos 11 dias e nas folhas e raízes das plantas aos 18 dias de estresse salino. Dessa forma, houve influência da fonte de N na relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , particularmente nas raízes das plantas aos 18 dias de exposição ao estresse salino, cujos menores aumentos nesse parâmetro foram observados nas plantas tratadas apenas com  $\text{NO}_3^-$ . Os maiores incrementos nos teores de  $\text{Cl}^-$  causados pela salinidade foram observados nas plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Porém, em condições controle, esses teores foram aumentados nas folhas e colmos das plantas cultivadas apenas com  $\text{NH}_4^+$ . Os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram maiores nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , quando comparadas às nutridas somente com  $\text{NH}_4^+$ , tanto em condições controle quanto de salinidade. A maior e a menor relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  foram encontradas, respectivamente, nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e com  $\text{NH}_4^+$ . Os teores de  $\text{NH}_4^+$  da parte aérea foram pouco influenciados pela salinidade ou pela fonte de N, porém, nas raízes das plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  e sob



salinidade, houve um grande acúmulo desses íons aos 18 dias de estresse. Os teores de carboidratos solúveis foram, em geral, aumentados pela salinidade, com exceção nas folhas e colmos (aos 18 dias de estresse salino) e nas raízes (durante todo o período experimental) das plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ . De maneira geral, os teores de proteínas solúveis e de N-aminossolúveis foram aumentados pela salinidade, sendo que as maiores quantidades destes solutos foram observadas nas raízes das plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  e aos 18 dias de estresse salino. Os teores de N-total foram reduzidos pela salinidade, sendo isto observado especialmente nas plantas nutridas apenas com  $\text{NO}_3^-$ . Nas folhas, as atividades da redutase do nitrato (NR) e da redutase do nitrito (NiR) foram maiores nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Foi observada pouca influência da salinidade na atividade da NiR das folhas de milho. Nas folhas, a salinidade influenciou diferentemente a atividade da sintetase da glutamina (GS) entre as diferentes fontes de N e tempos de exposição à salinidade. Porém, nas raízes, de maneira geral, a atividade da GS aumentou com a salinidade, com exceção das plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , que não foram influenciadas por este estresse. Aos 18 dias de exposição à salinidade, a atividade da GS foi maior nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em comparação com os demais tratamentos de N. A atividade da sintase do glutamato (GOGAT), nas folhas, em geral, aumentou com a salinidade, contudo, nas raízes essa atividade foi reduzida principalmente nas plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , aos 4 dias, e com  $\text{NH}_4^+$ , aos 11 e 18 dias. Esses resultados sugerem que as diversas fontes de N não influenciaram na tolerância das plantas de milho à salinidade, entretanto as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  foram melhores nas relações iônicas e as maiores atividades da GS observadas nas raízes das plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , aos 18 dias de estresse, ajudaram no ajustamento osmótico, como consequência do acúmulo de proteínas solúveis e N-aminossolúveis.

**Palavras-chave:** fontes de nitrogênio, metabolismo do N, salinidade, solutos inorgânicos, *Zea mays*.

## ABSTRACT

This work aimed to study the effect of N source in the growing, gas exchanges, ion partitions and N metabolism in maize plants (*Zea mays* L.) submitted to salinity. For this, maize seeds were sown in plastic cups with vermiculite and maintained in greenhouse. After that, the seedlings were transferred to a hydroponics culture with N concentration of 6 mM, in the forms of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  or  $\text{NH}_4^+$ . After five days in these conditions, we started the addition of NaCl, which was gradually increased each day by 25 mM until it reaches a final concentration of 100 mM. The harvests were carried out 4, 11 and 18 days after the beginning of the salt treatment. In control conditions, the plants fed with the mixed  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  were the ones which presented the greatest shoot growth, compared to other N treatments. There was a great growth reduction when the plants were submitted to salinity, but this effect was not influenced by the N source used. Generally, the salinity reduced the stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), photosynthesis ( $A$ ) and the relation between the intercellular and outercellular  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i/C_o$ ) in plants of all N treatments and in different times of harvest. However, in plants fed with  $\text{NH}_4^+$  and after 18 day of salt treatment a great reduction in the  $g_s$ ,  $A$  and  $E$  and an increase in the  $C_i/C_o$  ratio were observed. The  $\text{Na}^+$  contents increased with salinity, despite that, in plants fed with  $\text{NH}_4^+$ , these contents were lower than in the other N treatments in salinity conditions. The  $\text{K}^+$  contents, on the other hand, were reduced by salinity, and the plants fed with the mixed  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  and only  $\text{NH}_4^+$  absorbed less  $\text{K}^+$  than the ones fed only with  $\text{NO}_3^-$ , mainly in the leaves and stems of plants after 11 days and in leaves and roots of plants after 18 days of salt stress. This way, there was influence of N source in the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio, particularly in roots of plants after 18 days of exposure to salt stress, whose lower increases in this parameter were observed in the plants treated only with  $\text{NO}_3^-$ . The greatest increments in the  $\text{Cl}^-$  contents caused by salinity were observed in plants fed with  $\text{NO}_3^-$  and with the mixed  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . However, in control conditions, these contents were increased in leaves and stems of plants fed only with  $\text{NH}_4^+$ . The  $\text{NO}_3^-$  contents were higher in plants fed with  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , when compared to the ones fed only with  $\text{NH}_4^+$ , both in control and salinity conditions. The greatest and lowest  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  ratio were found, respectively, in plants treated with  $\text{NO}_3^-$  and with  $\text{NH}_4^+$ . The shoot  $\text{NH}_4^+$  contents were little influenced by salinity or by N source, however, in roots of plants fed with  $\text{NH}_4^+$  and under salinity, there was a great accumulation of these ions after 18 days of stress. The soluble carbohydrates contents, in general, increased by salinity, except in the leaves and stems (after 18 days of salt stress) and in the roots (during all the experimental period) of the

plants treated with  $\text{NH}_4^+$ . Generally, the soluble proteins and soluble amino acids contents were increased by salinity, and the biggest quantities of these solutes were observed in the roots of plants fed with  $\text{NH}_4^+$  and after 18 days of salt stress. The total N contents were reduced by salinity and it was observed especially in plants fed only with  $\text{NO}_3^-$ . In the leaves, the activities of nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR) were greater in plants fed with  $\text{NO}_3^-$  and with the mixed  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Little influence of salinity in NiR activity was observed in maize leaves. In the leaves, the salinity influenced differently the activity of glutamine synthetase (GS) between the different sources of N and time of salt exposure. However, in the roots, in general, the GS activity increased with salinity, except for the plants fed with  $\text{NH}_4^+$ , which were not influenced by this stress. After 18 days of salt exposure, the GS activity was greater in the plants fed with  $\text{NH}_4^+$ , compared to the other N treatments. The activity of glutamate synthase (GOGAT), in the leaves, in general, increased with salinity, despite that, this activity was reduced in the roots mainly in the plants fed with  $\text{NO}_3^-$ , after 4 days, and with  $\text{NH}_4^+$ , after 11 and 18 days. These results suggest that the several N sources did not influence the tolerance of maize plants to salinity. However, the plants fed with  $\text{NO}_3^-$  had better results in ion relations. And greatest GS activities observed in roots of the plants fed with  $\text{NH}_4^+$ , after 18 days of stress, helped in the osmotic adjustment, as a consequence of the accumulation of soluble proteins and soluble amino acids.

**Key-words:** inorganic solutes, nitrogen sources, N metabolism, salinity, *Zea mays*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Matéria seca das folhas, dos colmos e das raízes e relação entre a matéria seca da parte aérea e das raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 47
- Figura 2.** Área foliar de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 51
- Figura 3.** Condutância estomática, transpiração, fotossíntese e a relação entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 53
- Figura 4.** Teores de Na<sup>+</sup> em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 58
- Figura 5.** Teores de K<sup>+</sup> em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 60
- Figura 6.** Relação Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 63
- Figura 7.** Teores de Cl<sup>-</sup> em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 66
- Figura 8.** Teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 69
- Figura 9.** Relação Cl<sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 71
- Figura 10.** Teores de amônio em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade..... 73
- Figura 11.** Teores de carboidratos em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à

idade.....	76
<b>Figura 12.</b> Teores de proteínas solúveis em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	79
<b>Figura 13.</b> Teores de N-aminossolúveis em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	81
<b>Figura 14.</b> Teores de N-total em folhas, colmos e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	85
<b>Figura 15.</b> Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	88
<b>Figura 16.</b> Atividade da redutase do nitrito em folhas e raízes de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	90
<b>Figura 17.</b> Atividade da sintetase da glutamina em folhas e raízes de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	92
<b>Figura 18.</b> Atividade da sintase do glutamato em folhas e raízes de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição dos macronutrientes nas soluções nutritivas para os diferentes tratamentos de N (concentrações em mM).....	36
<b>Tabela 2.</b> Resumo da análise de variância dos parâmetros de crescimento de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	46
<b>Tabela 3.</b> Resumo da análise de variância dos parâmetros de trocas gasosas de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	52
<b>Tabela 4.</b> Resumo da análise de variância dos teores de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ e da relação $\text{Na}^+/\text{K}^+$ de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	56
<b>Tabela 5.</b> Resumo da análise de variância dos teores de $\text{Cl}^-$ , $\text{NO}_3^-$ e da relação $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	65
<b>Tabela 6.</b> Resumo da análise de variância dos teores de $\text{NH}_4^+$ de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	72
<b>Tabela 7.</b> Resumo da análise de variância dos teores de carboidratos solúveis de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	75
<b>Tabela 8.</b> Resumo da análise de variância dos teores de proteínas solúveis e N-aminossolúveis de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	78
<b>Tabela 9.</b> Resumo da análise de variância dos teores de N-total de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	84
<b>Tabela 10.</b> Resumo da análise de variância da atividade da redutase do nitrato (NR), da redutase do nitrito (NiR), da sintetase da glutamina (GS) e da sintase do glutamato (GOGAT) em plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade.....	87

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Justificativa.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Objetivos.....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Objetivo geral.....	17
1.2.2. Objetivos específicos.....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Aspectos gerais dos efeitos da salinidade nas plantas.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Disponibilidade de N no solo.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3. Absorção e transporte de <math>\text{NO}_3^-</math>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Absorção e transporte de <math>\text{NH}_4^+</math>.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Assimilação de N.....</b>	<b>24</b>
2.5.1. Redução do $\text{NO}_3^-$ a $\text{NH}_4^+$ .....	25
2.5.2. Assimilação do $\text{NH}_4^+$ .....	27
<b>2.6. Respostas das plantas submetidas à salinidade e a diferentes fontes de N.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7. O milho.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Material vegetal e condições de cultivo.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Análise de crescimento.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3. Trocas gasosas.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4. Determinação dos teores de íons.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5. Determinação dos carboidratos solúveis.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6. Determinação de compostos nitrogenados.....</b>	<b>39</b>
<b>3.7. Determinação de nitrogênio total.....</b>	<b>40</b>
<b>3.8. Atividades enzimáticas.....</b>	<b>41</b>
3.8.1. Coleta e armazenamento do material vegetal.....	41

3.8.2. Redutase do nitrato (NR) <i>in vivo</i> .....	41
3.8.3. Redutase do nitrito (NiR).....	42
3.8.4. Sintetase da glutamina (GS).....	43
3.8.5. Sintase do glutamato (GOGAT).....	44
<b>3.9. Delineamento experimental e análise estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Crescimento vegetativo.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2. Trocas gasosas.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3. Teores de íons.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4. Carboidratos solúveis.....</b>	<b>74</b>
<b>4.5. Compostos nitrogenados.....</b>	<b>77</b>
<b>4.6. Nitrogênio total.....</b>	<b>83</b>
<b>4.7. Enzimas do metabolismo do N.....</b>	<b>86</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Justificativa

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais limita o crescimento e a produtividade agrícola, sendo este problema mais severo nas regiões áridas e semi-áridas (ZHU, 2001). No Brasil, solos salinizados são mais frequentes na região Nordeste, na qual o semi-árido abrange 52% de sua área (LIRA *et al.*, 1982). O manejo inadequado do solo e da água associado às elevadas taxas evapotranspiratórias e baixas precipitações pluviométricas, características desta região, também contribuem para o surgimento de solos salinizados (FAGERIA; GHEYI, 1997).

A salinidade reduz o crescimento das plantas em decorrência de seus efeitos osmóticos e iônicos (MUNNS, 2002). Dessa forma, já é bem conhecido que o estresse salino afeta a absorção e a assimilação de vários nutrientes essenciais requeridos para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas (KANT *et al.*, 2007; CARILLO *et al.*, 2008).

Dentre os nutrientes minerais essenciais, o nitrogênio destaca-se por ser requerido em maiores quantidades pelas plantas, perfazendo cerca de 2% da sua matéria seca total (MILLER; CRAMER, 2004). É constituinte de muitas biomoléculas tais como proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, coenzimas, vitaminas e pigmentos (DUBEY; PESSARAKLI, 2001). Desta forma, as plantas requerem nitrogênio em altas concentrações e sua deficiência inibe rapidamente o crescimento vegetal e, conseqüentemente, a produção (DUBEY; PESSARAKLI, 2001; MILLER; CRAMER, 2004).

O nitrogênio presente no solo apresenta-se sob as formas de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), aminoácidos, peptídeos e compostos nitrogenados insolúveis. A absorção de N sob cada uma destas formas varia entre as espécies, mas, de modo geral, ocorre como N inorgânico ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$ ), sendo o  $\text{NO}_3^-$  a fonte preferencialmente absorvida pelas plantas

que crescem em solos aeróbicos (FORDE, 2000; WILLIAMS; MILLER, 2001). Sabe-se há muito tempo que a utilização do  $\text{NO}_3^-$  ou do  $\text{NH}_4^+$  como fontes de N causa diferentes efeitos no crescimento e na composição química das plantas (LEWIS; CHADWICK, 1983; LIPS *et al.*, 1990; AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001). Dessa maneira, as espécies vegetais diferem em sua habilidade de absorver e assimilar  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  como fontes de N (LEWIS; JAMES; HEWITT, 1982; MAGALHÃES; HUBER, 1989).

A salinidade interfere na aquisição e na utilização do N. Assim, condições de salinidade podem influenciar os diferentes passos do metabolismo do N, tais como a absorção, a assimilação e a síntese de proteínas, o que pode ser responsável, pelo menos em parte, pela redução na taxa de crescimento das plantas sob tais condições (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; FRECHILLA *et al.*, 2001; DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007). A fotossíntese também é afetada pela salinidade, pelo *status* de N na planta e pela fonte de N empregada (KHAMIS *et al.*, 1990; BENDIXEN, *et al.*, 2001; GUO *et al.*, 2007).

Tem sido demonstrado que a forma como o N é fornecido pode influenciar nas respostas das plantas à salinidade (EHLTING *et al.*, 2007), sendo essas respostas muito variáveis e dependentes da espécie estudada. Assim, em ervilha e em *Populus tremula*, foi observada uma maior sensibilidade à salinidade quando o amônio foi a forma de N empregada (FRECHILLA *et al.*, 2001; EHLTING *et al.*, 2007). Por outro lado, em trigo, isto ocorreu quando o  $\text{NO}_3^-$  foi o íon utilizado (BOTELLA *et al.*, 1997), enquanto que em plantas de amendoim, não foi verificado nenhum efeito da fonte de nitrogênio na resposta ao estresse salino (SILBERBUSH; LIPS, 1988). Além disso, várias espécies vegetais mostraram uma melhoria no crescimento quando nutridas com ambas as fontes ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) em comparação às nutridas com uma única fonte de N (SIDDIQI *et al.*, 2002; KANT; KAFKAFI, 2003).

O controle do acúmulo de íons tóxicos, tais como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , é um processo fisiológico importante que confere tolerância aos sais nas plantas (ASHRAF, 1994) e esse controle pode

estar relacionado com a forma de N absorvida, uma vez que foram observados diferentes padrões de acúmulo e distribuição desses íons, dependendo da fonte de N empregada (SPEER; BRUNC; KAISER, 1994; ASHRAF; SULTANA, 2000). Além disso, a fonte de N influencia na assimilação do N, na síntese de aminoácidos, proteínas e carboidratos, que podem contribuir para o ajustamento osmótico (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992; BOTELLA; CERDA; LIPS, 1994; NATHAWAT *et al.*, 2005; KANT *et al.*, 2007).

Existe um número considerável de informações sobre a interação salinidade e N nas plantas, porém há uma carência de estudos que relacionem a produção de biomassa, a absorção de nutrientes e o comportamento das diversas etapas do metabolismo do N em plantas de milho submetidas a diferentes fontes de N e à salinidade. Visto que o milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância sócio-econômica, sendo encontrada praticamente em todo o cenário nacional, movimentando a economia formal e informal de quase todo o país (ALMEIDA, 1993; PINAZZA, 1993) e dada a elevada exigência por N em seu cultivo (MACHADO *et al.*, 2004), tornam-se relevantes estudos sobre a interação salinidade e N nessa cultura, já que a mesma é considerada sensível ao excesso de sais no solo.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo geral**

Estudar o efeito da fonte de N no crescimento, nas trocas gasosas, na partição de íons e no metabolismo do N em plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas à salinidade.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

1. Analisar o efeito da salinidade no crescimento e nas trocas gasosas de plantas de milho submetidas a diferentes fontes de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ );

2. Investigar o efeito do NaCl e da fonte de N no acúmulo e distribuição de íons ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ ) em folhas, colmos e raízes de plantas de milho;
3. Estudar o efeito do NaCl e da fonte de N no acúmulo de carboidratos solúveis, compostos nitrogenados (proteínas solúveis e N-aminossolúveis) e nitrogênio total nos diversos órgãos das plantas de milho;
4. Avaliar a atividade das enzimas envolvidas na assimilação do N (redutase do nitrato, redutase do nitrito, sintetase da glutamina e sintase do glutamato) em folhas e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes fontes de N e à salinidade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos gerais dos efeitos da salinidade nas plantas

A salinidade é um dos principais fatores limitantes da produção agrícola, em razão de seus efeitos no crescimento e no desenvolvimento vegetal — os quais podem ser de natureza iônica ou osmótica (HASEGAWA *et al.*, 2000; YOKOI; BRESSAN; HASEGAWA, 2002). Os efeitos deletérios da salinidade sobre o crescimento das plantas são devidos aos seguintes fatores: 1) diminuição da quantidade de água disponível para a planta, em razão da redução do potencial hídrico do solo; 2) toxicidade causada pela elevada absorção de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , principalmente; e 3) desbalanço nutricional ocasionado pela inibição da absorção de vários nutrientes (GREENWAY; MUNNS, 1980).

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

Uma das respostas das plantas ao estresse hídrico, provocado pelo excesso de sais, é a redução na condutância estomática, causando uma diminuição na fotossíntese líquida. Assim, apesar de reduzir a perda de água através da transpiração, a curto prazo, o fechamento dos estômatos é o principal fator limitante da fotossíntese (GREENWAY; MUNNS, 1980; DAVIES; ZHANG, 1991). A longo prazo, o excesso de íons tóxicos no mesófilo inibe a

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

Elevadas concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na solução do solo acarretam altas relações  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  (GRATTAN; GRIEVE, 1999). Estes desequilíbrios nutricionais, causados pela salinidade, podem resultar do efeito dos sais sobre a disponibilidade do nutriente, pela competição na absorção, no transporte ou na partição dentro da planta, na integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, na redução da atividade de várias enzimas vitais, bem como pela inativação fisiológica de um dado nutriente, resultando no aumento do requerimento da planta por esse elemento essencial (GRATTAN; GRIEVE, 1994; ZHU, 2001; MANSOUR; SALAMA, 2004). Assim, em geral, o excesso de  $\text{Na}^+$  pode conduzir à deficiência de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e a absorção de  $\text{NO}_3^-$  pode ser inibida por  $\text{Cl}^-$  (SHANNON, 1992). Como resultado, a planta torna-se susceptível a distúrbios

osmóticos ou íons-específicos, bem como a desordens nutricionais que podem resultar na redução da produção ou da qualidade das culturas (GRATTAN; GRIEVE, 1999).

A sobrevivência das plantas em ambientes salinos depende da manutenção da concentração iônica intracelular, a qual é importante para a manutenção dos processos metabólicos que controlam o crescimento e o desenvolvimento vegetal (NIU *et al.*, 1995). Dessa forma, processos fisiológicos importantes, tais como a compartimentalização dos íons no vacúolo e o controle do seu transporte para as folhas podem conferir tolerância aos sais (ASHRAF, 1994; PARIDA; DAS, 2005).

## 2.2. Disponibilidade de N no solo

A maior parte do N no solo está presente na forma de moléculas orgânicas complexas, as quais são convertidas a  $\text{NH}_4^+$  por microorganismos do solo através da mineralização. O amônio pode então ser oxidado a  $\text{NO}_3^-$  através de um processo denominado nitrificação, realizado pela ação de bactérias *Nitrosomonas* ssp. ( $\text{NH}_3 + 1\frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ ) e *Nitrobacter* ssp. ( $\text{NO}_2^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ ). O  $\text{NO}_3^-$ , por sua vez, pode ser convertido a  $\text{N}_2$  ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ), através de seu uso como acceptor de elétrons por bactérias desnitrificantes (*Pseudomonas* ssp. e *Paracoccus* ssp.) (MILLER; CRAMER, 2004).

As principais formas de N inorgânico utilizadas pelas plantas são  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . A concentração de  $\text{NO}_3^-$  no solo varia entre 1 e 5 mM, podendo-se alcançar valores de até 5  $\mu\text{M}$ , em consequência de sua ampla utilização pelas plantas e microorganismos e, adicionalmente, de sua lixiviação do solo (MENGEL; KIRKBY, 1987; OWEN; JONES, 2001; MILLER; CRAMER, 2004). As concentrações de  $\text{NH}_4^+$  em solos agricultáveis, tipicamente, variam entre 20 e 200  $\mu\text{M}$  (OWEN; JONES, 2001). Contudo, fatores que inibem o processo de nitrificação, tais como, pH baixo, condições anaeróbicas e temperaturas abaixo de 5°C e acima de 40°C, podem resultar no acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  no solo (LEWIS, 1986; MENGEL;

KIRKBY, 1987; MILLER; CRAMER, 2004). Altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  são potencialmente tóxicas para algumas espécies, acarretando problemas com o equilíbrio de pH (RAVEN, SMITH, 1976), com a relação ânion/cátion (CHAILLOU; LAMAZE, 2001) e/ou com o escoamento de energia resultante do efluxo de íons (BRITO; KRONZUCKER, 2002). O  $\text{NH}_4^+$  é relativamente imóvel no solo e menos facilmente perdido pela lixiviação do solo que o  $\text{NO}_3^-$  (MILLER; CRAMER, 2004).

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

### 2.3. Absorção e transporte de $\text{NO}_3^-$

As plantas absorvem o  $\text{NO}_3^-$  presente na solução do solo através da membrana plasmática de células da epiderme e do córtex da raiz, principalmente nas regiões mais jovens (região apical) (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esse processo ocorre por meio de um transporte simultâneo (co-transporte) de 2  $\text{H}^+$  e um  $\text{NO}_3^-$  do meio externo para o interior da célula, o qual é dirigido pelo gradiente de prótons ( $\Delta\text{H}^+$ ) gerado pelas  $\text{H}^+$ -ATPases da membrana plasmática, sendo, portanto, dependente de ATP (FORDE, 2000). Em *Citrus*, a absorção de  $\text{NO}_3^-$  foi severamente afetada pela presença de inibidores e desacopladores da fosforilação oxidativa, denotando a inter-relação entre a absorção de  $\text{NO}_3^-$  e o  $\Delta\text{H}^+$  gerado pelas  $\text{H}^+$ -ATPases (CEREZO *et al.*, 2000).

Ao longo dos últimos anos, as evidências advindas de estudos sobre cinética de absorção levam a crer que existem três diferentes sistemas de absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas plantas.



Eles são definidos com base na concentração externa de  $\text{NO}_3^-$  em que operam, sendo dois deles de alta afinidade, os quais atuam em concentrações externas de  $\text{NO}_3^-$  inferiores a 1 mM, enquanto o terceiro possui baixa afinidade e atua em concentrações externas de  $\text{NO}_3^-$  superiores a 1 mM (FORDE, 2000; WILLIAMS; MILLER, 2001).

Dentre os sistemas de alta afinidade, um deles é fortemente induzido pela presença de  $\text{NO}_3^-$  no meio externo, sendo conhecido como iHATS (do inglês, *Inducible High-Affinity Transport System*), enquanto o outro é constitutivamente expresso, sendo denominado cHATS (do inglês, *Constitutive High-Affinity Transport System*). Segundo Forde (2000), o cHATS tem uma afinidade maior por  $\text{NO}_3^-$  (valores de  $K_m$  variando entre 6 e 20  $\mu\text{M}$ ) do que o iHATS (valores de  $K_m$  variando entre 13 e 79  $\mu\text{M}$ ), embora este último absorva  $\text{NO}_3^-$  a uma taxa mais elevada. Por sua vez, o sistema de absorção de  $\text{NO}_3^-$  de baixa afinidade, conhecido como LATS (do inglês, *Low-Affinity Transport System*), é também constitutivamente expresso, apresentando cinética de absorção linear e não-saturável (FORDE, 2000).

No interior da célula, o  $\text{NO}_3^-$  pode assumir quatro diferentes rotas: (a) ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$ , o qual, por sua vez, é posteriormente assimilado em compostos orgânicos; (b) sofrer efluxo para o apoplasto, através da membrana plasmática; (c) sofrer influxo para o vacúolo, através do tonoplasto; ou (d) ser transportado para a parte aérea, via xilema, para ser assimilado nas folhas, uma vez que somente parte do  $\text{NO}_3^-$  absorvido é assimilado nas raízes (CRAWFORD & GLASS, 1998; FORDE, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2004).

#### **2.4. Absorção e transporte de $\text{NH}_4^+$**

Assim como para o  $\text{NO}_3^-$ , a absorção do  $\text{NH}_4^+$  presente na solução do solo se dá através da membrana plasmática de células da epiderme e do córtex da região apical da raiz (TAIZ; ZEIGER, 2004). Evidências tomadas a partir de medidas de eletrofisiologia e estudos de absorção de  $^{13}\text{NH}_4^+$  apontam para a existência de dois sistemas de absorção de  $\text{NH}_4^+$  em

plantas, um de alta afinidade e outro de baixa afinidade (WANG *et al.*, 1994; KRONZUCKER; SIDDIQI; GLASS, 1996). O sistema de absorção de  $\text{NH}_4^+$  de baixa afinidade é mediado primariamente por canais (DAVENPORT; TESTER, 2000). Além disso, há evidências de que o  $\text{NH}_4^+$  também possa ser absorvido através de canais de  $\text{K}^+$ , sendo dirigido, principalmente, pelo potencial de membrana negativo das células vegetais (WHITE, 1996; WILLIAMS; MILLER, 2001). Já o sistema de transporte de alta afinidade ocorre via transportadores do tipo simporte  $\text{H}^+/\text{NH}_4^+$  ( $K_m$  entre 10-200  $\mu\text{M}$ ), os quais mostram baixa afinidade por  $\text{K}^+$  (WILLIAMS; MILLER, 2001). O limiar entre esses dois mecanismos depende da concentração citosólica do  $\text{NH}_4^+$ , sendo este parâmetro dependente da sua concentração externa (KRONZUCKER; SIDDIQI; GLASS, 1995). Diferentemente do  $\text{NO}_3^-$ , o  $\text{NH}_4^+$  é, em geral, completamente convertido em N orgânico nas raízes, antes de serem translocados para as outras partes da planta (IVANKO; INGUERSEN, 1971; RAVEN; SMITH, 1976).

## 2.5. Assimilação do N

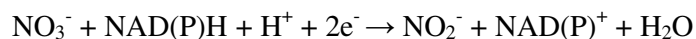
Para que possa ser incorporado em estruturas orgânicas e cumprir suas funções essenciais como nutriente para as plantas, o  $\text{NO}_3^-$  deve ser inicialmente reduzido a  $\text{NH}_4^+$  (MARSCHNER, 1995). O íon  $\text{NO}_3^-$  é reduzido pela reação seqüencial da redutase do nitrato (NR, EC 1.6.6.1), no citosol, e da redutase do nitrito (NiR, EC 1.6.6.4), nos plastídeos e/ou cloroplastos. O íon  $\text{NH}_4^+$  derivado da redução primária do  $\text{NO}_3^-$ , bem como de outras vias metabólicas (absorção direta pelas raízes, fotorrespiração e catabolismo dos aminoácidos) é então convertido primeiramente a glutamina, pela enzima sintetase da glutamina (GS, EC 6.3.1.2), e, em seguida, a glutamato, pela ação da enzima sintase do glutamato (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1 e NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) (IRELAND; LEA, 1999). O íon  $\text{NH}_4^+$  pode também ser assimilado por uma via alternativa, através da reação reversível da enzima

glutamato desidrogenase (NADH-GDH, EC 1.4.7.1), que sintetiza ou desamina o aminoácido glutamato, porém, essa via só ocorre em condições de excesso de  $\text{NH}_4^+$  (CORUZZI; LAST, 2000).

O local em que ocorre a redução do  $\text{NO}_3^-$  e a subsequente assimilação a  $\text{NH}_4^+$  (na raiz ou na parte aérea) varia entre as espécies, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais (MILLER; CRAMER, 2004). Contudo, as raízes são responsáveis por 5% a 95% deste processo, o qual será dirigido pelo suprimento de N em ambos os órgãos (CRAWFORD; GLASS, 1998). A importância da assimilação do N para a vida da planta é comparável à assimilação do C na fotossíntese (MARSCHNER, 1995).

### 2.5.1. Redução do $\text{NO}_3^-$ a $\text{NH}_4^+$

A NR é a enzima que catalisa o primeiro passo da redução do  $\text{NO}_3^-$  e está localizada no citosol (TISCHNER, 2000). A reação catalisada é a seguinte:



Essa reação leva à produção de  $\text{NO}_2^-$  e necessita de NADH/NADPH ou de ambos (biespecífica) como doador de elétrons (TISCHNER, 2000). A isoforma mais comum da NR é NADH-específica, no entanto, em tecidos não-clorofilados, tal como a raiz, há uma outra isoforma, a qual pode utilizar tanto o NADH como o NADPH como doadores de elétrons (WILKINSON; CRAWFORD, 1993). A NR é um homodímero composto de duas subunidades idênticas de aproximadamente 100 kDa, cada uma contendo três grupos prostéticos: flavina adenina dinucleotídeo (FAD), heme-Fe e um complexo formado entre o molibdênio e uma molécula orgânica denominada pterina, o Mo-molibdopterina (Mo-MPT) (CAMPBELL, 1999).

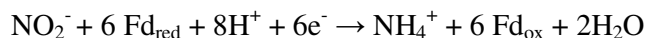
O mecanismo da NR envolve a passagem dos elétrons do NADH/NADPH para o  $\text{NO}_3^-$  a partir do grupo carboxila terminal (C-terminal) da enzima até o grupo amino terminal (N-

terminal). O sítio específico em que ocorre a redução do  $\text{NO}_3^-$  corresponde ao complexo Mo-MPT (TAIZ; ZEIGER, 2004). Stöhr e Ullrich (2002) descreveram uma forma de NR que é encontrada na membrana plasmática e que pode gerar óxido nítrico (NO), porém o significado dessa atividade permanece incerto.

O  $\text{NO}_3^-$  induz a atividade da NR por alteração na expressão de seus genes aumentando a transcrição dos mesmos (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1991). Essa indução é bastante rápida, ocorrendo em minutos e requerendo baixíssimas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  (menores que 10  $\mu\text{M}$ ) (CRAWFORD, 1995). Utilizando anticorpos específicos para a NR, Remmler e Campbell (1985) demonstraram que, em folhas de plantas de milho e cevada, a indução da atividade da NR por  $\text{NO}_3^-$  envolveu o processo de síntese *de novo*. Adicionalmente, a expressão dos genes da NR (*NIA*) pode ser regulada pelos produtos finais do processo de assimilação do N (como os aminoácidos glutamina, glutamato e asparagina), através de *feedback* negativo (STITT *et al.*, 2002), bem como por baixos níveis de açúcares e outros assimilados, através de *feedback* positivo (NUSSAUME *et al.*, 1995).

Além da regulação a nível transcricional, a atividade da enzima NR pode ser modulada por fosforilação reversível de um resíduo de serina da proteína. Porém foi demonstrado que a fosforilação *per se* não é suficiente para inativar a NR, sendo necessária uma proteína adicional, a NIP (do inglês *Nitrate Reductase Inhibitor Protein*), identificada como um dímero de proteínas 14-3-3 que, na presença de íons bivalentes, liga-se à NR previamente fosforilada, causando sua inibição completa (KAISER; HUBER, 2001). Algumas mudanças ambientais podem causar a desfosforilação da NR, sendo esta enzima ativada em condições de luz, anoxia, altas concentrações de  $\text{CO}_2$  e açúcares (KAISER; FOSTER, 1989; KAISER; BRENDLE-BEHNISCH, 1991; DEBOUBA *et al.*, 2006b).

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

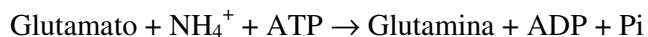


onde  $\text{Fd}_{\text{red}}$  e  $\text{Fd}_{\text{ox}}$  representam a ferredoxina na forma reduzida e oxidada, respectivamente.

Nos cloroplastos, o doador de elétrons para a NiR é a  $\text{Fd}_{\text{red}}$  derivada do transporte de elétrons das reações fotoquímicas da fotossíntese e, nos tecidos não-verdes, a  $\text{Fd}_{\text{red}}$  é originada do NADPH gerado pela via das pentoses-fosfato. A NiR consiste de um polipeptídeo monomérico com cerca de 60 a 63 kDa, contendo dois grupos prostéticos: um grupo ferro-enxofre,  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ , e um grupo heme especializado. Tais grupos agem em conjunto, ligando-se ao  $\text{NO}_2^-$  e reduzindo-o diretamente a  $\text{NH}_4^+$ . Existem diversas isoformas dessa enzima nas folhas e raízes, porém todas possuem a mesma estrutura geral (MARSCHNER, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004). O nitrato e a luz também induzem essa enzima e, desta maneira, NR e NiR são co-reguladas. Em tabaco, os níveis de mRNA das enzimas NR e NiR flutuaram em uma faixa de ritmo circadiano, com similar cronometragem de acúmulos máximos e mínimos de transcritos (FAURE *et al.*, 1991).

### 2.5.2. Assimilação do $\text{NH}_4^+$

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



A GS tem massa molecular de 350 kDa e é composta de oito subunidades aproximadamente idênticas. Essa enzima é muitas vezes encontrada como múltiplas isoenzimas, localizadas no citosol (GS1) e no cloroplasto/plastídio (GS2), as quais possuem papéis distintos (IRELAND; LEA, 1999). A GS1 citosólica desempenha um importante papel na assimilação primária do N nas raízes, e sua função é gerar glutamina para ser transportada pelo floema. A GS2 cloroplastídica possui um papel crucial na reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  liberado na fotorrespiração das plantas (WALLSGROVE *et al.*, 1987). Os níveis de carboidratos e a luz alteram a expressão das isoformas dessa enzima presentes nos plastídeos, mas apresentam pouco efeito nas formas citosólicas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

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



A NADH-GOGAT está localizada nos plastídeos de tecidos não-fotossintetizantes e está envolvida com a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  absorvido da rizosfera (TAIZ; ZEIGER, 2004). A GOGAT dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) é constituída por um único polipetídeo com massa molecular em torno de 140 a 165 kDa (LEA, 1999), sendo encontrada nos cloroplastos e sua função é agir no processo de fotorrespiração. Altos níveis de glutamina e luz estimulam a atividade da Fd-GOGAT (TAIZ; ZEIGER, 2004).

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

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

As respostas do crescimento, da absorção de íons e das enzimas de assimilação do N à fertilização nitrogenada, sob condições salinas e não salinas, variam de acordo com a fonte de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) e dependem também da espécie vegetal (NATHAWAT *et al.*, 2005; KANT *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2007). Várias glicófitas, tais como milho, trigo e ervilha, foram mais sensíveis aos sais quando somente o  $\text{NH}_4^+$  estava presente no meio (LEWIS, LEIDI; LIPS, 1989; SPEER; KAISER, 1994; AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001). Além disso, plantas de arroz mostraram maior tolerância aos sais quando cresceram em ambiente com baixa concentração de  $\text{NH}_4^+$ , em comparação àquelas submetidas a  $\text{NO}_3^-$  e à altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  (YAMAMOTO *et al.*, 2004). Contudo, não foi observado efeito da forma de N em plantas de amendoim e soja sob estresse salino (SILBERBUSH; LIPS, 1988; BOURGEGEIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992).

Vários fatores estão envolvidos na preferência das plantas pelo suprimento de N (se  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ), de modo a conferir maior crescimento e produção. Plantas adaptadas a solos ácidos e com baixo potencial redox, preferem o  $\text{NH}_4^+$ , enquanto plantas que crescem melhor em solos com pH alto, preferem o  $\text{NO}_3^-$  (MARSCHNER, 1995). A preferência da fonte de N em plantas superiores, entretanto, parece estar associada com a forma de nitrogênio inorgânico que prevalece em seu habitat natural. Dessa maneira, pode-se esperar que plantas que crescem em solos alagados, onde o  $\text{NH}_4^+$  é a forma de N inorgânico dominante, irão dar preferência a esta forma de N (BRIX *et al.*, 2002). Como os íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  compreendem cerca de 80% dos cátions e ânions absorvidos pelas plantas, a forma de suprimento de N tem

um grande impacto na absorção de outros ânions e cátions, na regulação do pH celular e no pH da rizosfera (MARSCHNER, 1995).

A absorção do  $\text{NH}_4^+$  resulta na acidificação da rizosfera, possivelmente como uma consequência da manutenção do balanço de cargas dentro da planta para compensar a absorção do  $\text{NH}_4^+$ . Outro candidato que pode causar toxicidade associada com o  $\text{NH}_4^+$  é a suposta mudança no pH citosólico induzido pela liberação de  $\text{H}^+$  a partir do  $\text{NH}_4^+$  durante a sua assimilação em aminoácidos (MILLER; CRAMER, 2004). Além disso, existem muitas outras reações associadas com a absorção e a assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , que podem ter implicações no pH, como por exemplo, a atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato (PEPc) e a síntese de aminoácidos (BRITO; KRONZUCKER, 2002). O desbalanço cátion-ânion que resulta da troca da fonte de N, de  $\text{NO}_3^-$  para  $\text{NH}_4^+$ , é o principal fator gerador de toxicidade conhecido como “síndrome amoniacal” (CHAILLOU; LAMAZE, 2001), o qual leva à redução da concentração de cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e aumento da concentração de ânions orgânicos (ácido carboxílico) e inorgânicos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{2-}$ ) (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; MILLER; CRAMER, 2004). Dessa forma, a toxicidade do  $\text{NH}_4^+$  pode ser relacionada à deficiência de  $\text{K}^+$  que ocorre por competição entre este íon e o  $\text{NH}_4^+$  pelos sítios de absorção na membrana plasmática (SHAVIV *et al.*, 1990). Dessa maneira, parece razoável que plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  necessitem mais de  $\text{K}^+$  do que aquelas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ . A esse respeito, Lips *et al.* (1990) observaram um aumento no crescimento de plantas de tomate e trigo pelo aumento da concentração de  $\text{K}^+$  no meio, mas não obtiveram resposta em plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ . Devido à competição entre o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{NH}_4^+$ , foi encontrado que o aumento da relação  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  reduziu a concentração de  $\text{Na}^+$  em folhas de plantas de trigo (SILBERBUSH; LIPS, 1988).

Com relação à salinidade e à nutrição com  $\text{NH}_4^+$ , plantas de trigo nutridas com este íon comparadas com as nutridas com  $\text{NO}_3^-$  foram mais sensíveis aos sais pela inibição da



absorção de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ . Além disso, não foi observada uma competição entre os íons  $Na^+$  e  $NH_4^+$ , havendo uma promoção da absorção de  $Na^+$  nas plantas nutridas com  $NH_4^+$ , particularmente em condições de estresse salino (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001). Contudo, em cevada, foi observado um maior decréscimo no conteúdo de  $Na^+$  nas diversas partes das plantas nutridas com a mistura  $NO_3^-/NH_4^+$ , em comparação com as nutridas com somente  $NO_3^-$ . Entretanto, esse decréscimo no acúmulo de  $Na^+$  foi apenas ligeiramente relacionado com a redução dos efeitos deletérios da salinidade encontrada nesse regime de N (KANT *et al.*, 2007).

O acúmulo de  $Cl^-$  é geralmente maior nas plantas nutridas com  $NH_4^+$  do que naquelas nutridas com  $NO_3^-$ . Como as plantas nutridas com  $NO_3^-$  contêm altas concentrações deste íon, a competição entre o  $NO_3^-$  e o  $Cl^-$  (GLASS; SIDDIQI, 1985) parece ser decisiva para a menor absorção e transporte de  $Cl^-$  em condições de salinidade (MAHMOOD; KAISER, 2003). Em *Leptochoa fusca*, sob condições de salinidade, as plantas nutridas com  $NH_4^+$  absorveram mais  $Cl^-$  do que as nutridas com  $NO_3^-$ , porém a fonte de N não afetou o crescimento da parte aérea dessas plantas (MAHMOOD; KAISER, 2003). Em ervilha, os teores de  $Cl^-$  também foram maiores nas plantas nutridas com  $NH_4^+$ , porém, esses teores foram menos afetados pela salinidade quando comparados com os das plantas nutridas com  $NO_3^-$  (FRECHILLA *et al.*, 2001).

Em vários trabalhos, a competição entre os íons  $NO_3^-$  e  $Cl^-$  tem sido bastante discutida. Assim, diferentes autores têm relatado que a absorção de  $NO_3^-$  é inibida pela salinidade, o que resulta em níveis reduzidos desse íon nos tecidos (GOUIA; GHORBAL; TOURINE, 1994; SILVEIRA *et al.*, 2001; PARIDA; DAS, 2004). O efeito deletério da salinidade sobre a absorção de  $NO_3^-$  está mais relacionado à competição direta do íon  $Cl^-$  pelos sítios transportadores de  $NO_3^-$  do que com a diminuição da taxa de transpiração (CEREZO *et al.*, 1999). Cerezo *et al.* (1997), estudando a cinética de absorção de  $NO_3^-$  em *Citrus*, sob

condições de salinidade, observaram que houve um aumento significativo nos valores de  $K_m$  à medida que a concentração de  $Cl^-$  no meio aumentava, o que denota uma diminuição na afinidade do transportador pelo seu substrato específico ( $NO_3^-$ ).

A assimilação do  $NO_3^-$ , de fato, requer mais energia do que a do  $NH_4^+$ , haja vista que o  $NO_3^-$  deve ser reduzido a  $NH_4^+$ , para somente então ser incorporado em compostos orgânicos. A energia requerida para a assimilação de um íon  $NO_3^-$  é de 20 moléculas de ATP, enquanto que a assimilação de um íon  $NH_4^+$  requer somente cinco moléculas de ATP (KANT *et al.*, 2007). Nesse sentido, Kant *et al.* (2007) sugeriram que a economia de energia para a assimilação de N quando utiliza-se a mistura  $NO_3^-/NH_4^+$  pode reservar mais recursos energéticos para serem utilizados nos mecanismos de tolerância ao estresse salino. Contudo, Zerihum, McKenzie e Morton (1998) demonstraram que o custo energético para a assimilação do  $NO_3^-$  não é substancialmente maior que aquela para o  $NH_4^+$ , visto que o  $NO_3^-$  pode contribuir para o potencial osmótico, enquanto que o  $NH_4^+$  leva ao efluxo de  $H^+$  no meio, tendo, dessa forma, necessidade de regular o pH. Além disso, Kronzucker *et al.* (2001) especularam que em algumas espécies, a toxicidade do  $NH_4^+$  poderia ser explicada pelos elevados custos associados com a regulação da concentração interna de  $NH_4^+$ , através de efluxo contra o potencial de membrana.

Os efeitos deletérios da salinidade sobre o metabolismo do N pode ser atribuído ao decréscimo da absorção de N, decréscimo das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do N, alteração na síntese de aminoácidos e aumento na atividade de enzimas hidrolíticas, tais como RNase, DNase, protease, dentre outras, levando à degradação de macromoléculas (GARG *et al.*, 1990, 1993; GRATTAN; GRIEVE, 1994; NATHAWAT *et al.*, 2005). Entretanto, o efeito da salinidade no metabolismo do N depende da fonte de N (BOTELLA *et al.*, 1994; NATHAWAT *et al.*, 2005). Em plantas de mostarda, a salinidade inibiu a atividade de todas as enzimas do metabolismo do N estudadas (NR, NiR, GOGAT,

GS e GDH). As fontes de nitrogênio influenciaram as atividades dessas enzimas, tanto em condições controle, como de salinidade. O percentual de redução na atividade da NR e da NiR, em função da salinidade, foi máximo nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  e foi mínimo nas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , enquanto que o percentual de redução da GS, GOGAT e GDH pelo estresse salino foi máximo nas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e mínimo nas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  (NATHAWAT *et al.*, 2005). Bourgeais-Chaillou, Perez-Alfocea e Guerrier (1992) encontraram maiores atividades da GS, da GOGAT e da GDH nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  do que nas nutridas apenas com  $\text{NO}_3^-$ , tanto em condições controle, como de salinidade. Este fato trouxe conseqüências para o ajustamento osmótico, pois o aumento da GS levou a uma maior formação de glutamina e à biossíntese de outros solutos orgânicos, enquanto o aumento da GDH proveu glutamato e/ou  $\alpha$ -cetoglutarato para a síntese de clorofila e de aminoácidos (principalmente prolina) (VENEKAMP, 1989 citado por BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992).

## 2.7. O milho

O milho, uma planta originária das Américas, pertence à classe Monocotyledonea, ordem Glumiflorae, família Graminae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Z. mays* L. É uma planta monóica, anual, robusta e ereta, com um a quatro metros de altura. É um alimento energético por excelência, sendo seu grão composto, em média, de 71,3% de carboidratos e 9,1% de proteínas. Além disso, contém as vitaminas A e as do complexo B, além de cálcio, potássio, magnésio e enxofre. (PRATA, 1969).

Os maiores produtores mundiais de milho são Estados Unidos, China e Brasil. Em 2005, esses países produziram 280, 131 e 36 milhões de toneladas, respectivamente. De uma produção mundial total, no ano de 2005, de cerca de 708 milhões de toneladas (USDA, 2006, citado por GARCIA *et al.*, 2006), cerca de 75 milhões foram comercializadas

internacionalmente (aproximadamente 10% da produção total, em 2005). Isto indica que, mundialmente, o milho destina-se principalmente ao consumo interno (GARCIA *et al.*, 2006).

Pesquisas envolvendo melhoramento genético, realizadas em diferentes partes do mundo, têm desenvolvido diferentes tipos de milho (genótipos e/ou variedades), possibilitando o cultivo desta cultura desde o equador até o limite das terras temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3.600 m. Essa adaptabilidade, representada por genótipos variados, é paralela à variedade de sua utilização como alimento, forragem ou na indústria (MAGALHÃES *et al.*, 2002).

O milho é insumo para a produção de uma centena de produtos, porém, na cadeia produtiva de suínos e aves, são consumidos aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (PAES, 2006). O uso de grãos na alimentação humana tem menor importância econômica, porém derivados do milho constituem-se numa importante fonte de alimento nas regiões de baixa renda. No Brasil, cerca de 4% do total da produção de milho, tem sido utilizada diretamente como alimento humano e cerca de 10% da produção destinam-se às indústrias alimentícias, que transformam os grãos em diversos produtos, tais como amido, farinhas, canjica (mungunzá), flocos de milho e xaropes, entre outros. O milho é uma das mais importantes fontes alimentares da população brasileira, sendo a região Nordeste a maior consumidora de milho, apresentando um consumo *per capita* anual da ordem de 11 kg, valor este que está acima da média nacional (~7,7 kg), em cerca de 40%. Mas o consumo de milho na zona rural brasileira é ainda mais expressivo, sendo a zona rural da região Sudeste a grande consumidora de milho e seus derivados (31 kg/pessoa), seguida pela zona rural da região Nordeste (20 kg/pessoa) (PAES, 2006). Contudo, a aplicação do milho vai muito além da alimentícia e o uso de seus derivados estende-se às indústrias química, farmacêutica, de papéis, têxtil, automobilística, entre outras (PAES, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e as análises químicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, ambos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará. Sementes de milho (*Zea mays* L.), do genótipo BR5011, foram selecionadas e, em seguida, esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio comercial, contendo 2% de cloro residual (diluído 1:3) durante 5 minutos. Depois disso, as sementes foram exaustivamente lavadas com água destilada para a retirada do hipoclorito e, por fim, foram semeadas em copos plásticos descartáveis (200 mL), contendo vermiculita umedecida com água destilada. Decorridos sete dias da germinação, as plântulas foram selecionadas com base no critério de uniformidade, sendo transferidas para bandejas de 10 L contendo solução nutritiva de Hoagland modificada (diluída 1:2), contendo como fonte de nitrogênio (N) apenas  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  ou a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  na proporção de 1:1 (concentração final de 6 mM em N) (Tabela 1). Foi adicionado às soluções nutritivas 7,5  $\mu\text{M}$  de dicianidamida a fim de prevenir o processo de nitrificação.

Após cinco dias nestas condições, as plantas foram novamente selecionadas com base no critério de uniformidade e transferidas para baldes de 6 L (duas plantas/balde), sendo cada balde considerado uma repetição. Nesse mesmo dia, foi iniciada a adição de NaCl, que foi feita em parcelas de 25 mM por dia, até atingir a concentração final de 100 mM. O volume da solução foi mantido pela adição diária de água destilada. O pH permaneceu entre 5,0 e 6,0 pela adição de NaOH ou HCl a 1 N e a cada cinco dias a solução foi trocada por uma nova. As coletas foram realizadas aos 4, 11 e 18 dias do início da adição de sal.

**Tabela 1** – Composição dos macronutrientes nas soluções nutritivas para os diferentes tratamentos de N (concentrações em mM).

Sais	Concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (mM)		
	6/0	3/3	0/6
$\text{KNO}_3$	2,0	—	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2,0	—	—
$\text{NO}_3\text{NH}_4$	—	3,0	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	—	3,0
$\text{K}_2\text{SO}_4$	—	1,0	1,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4$	0,5	0,5	0,5
$\text{CaCl}_2$	—	1,0	1,0
$\text{CaSO}_4$	—	1,0	1,0
$\text{NaCl}$	2,0	—	—

Foram realizados dois experimentos independentes, um no mês de junho de 2008 e outro no mês de novembro do mesmo ano. No primeiro experimento foram analisados os efeitos dos tratamentos no crescimento, nas trocas gasosas e nos teores de solutos inorgânicos, compostos nitrogenados e nitrogênio total nas plantas de milho, enquanto no segundo, as análises concentraram-se no estudo das enzimas do metabolismo do nitrogênio. Durante os períodos experimentais, as medidas de temperatura e de umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foram registradas diariamente com um termohigrógrafo, sendo observados os valores, respectivamente, de  $28,5 \pm 0,63^\circ\text{C}$  e  $75,5 \pm 1,98\%$ , durante o primeiro experimento e  $31,5 \pm 0,99^\circ\text{C}$  e  $80,5 \pm 2,4\%$  no segundo experimento.

### 3.2. Análise de crescimento

Durante as coletas, as plantas foram divididas em folhas, colmos e raízes e, em seguida, foram feitas as medidas de matéria fresca e área foliar (LI – 3100, Area Meter, Licor., In. Lincoln, Nebraska, USA). O material coletado foi congelado a  $-20^\circ\text{C}$  e, em seguida, liofilizado. Após esse processo, foram determinadas as matérias secas da parte aérea e raízes. O material liofilizado foi macerado e armazenado em frascos de vidro a  $-20^\circ\text{C}$ , para posterior utilização.

### 3.3. Trocas gasosas

As medidas de fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e concentrações internas e externas de CO<sub>2</sub> foram realizadas no período da manhã (entre 8 e 30 min e 11 h e 30 min), utilizando-se, para isso, um analisador de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCI, ADC, Hoddesdon, UK), acoplado a uma fonte de radiação artificial (PSU, ADC, Hoddesdon, UK) com intensidade de aproximadamente 1.200  $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . As determinações foram feitas na porção mediana da primeira folha completamente expandida a partir do ápice.

### 3.4. Determinação dos teores de íons inorgânicos

Os teores de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram determinados nas diferentes partes das plantas. Os extratos brutos foram preparados de acordo com o método do Cataldo *et al.* (1975), com pequenas modificações. A proporção entre a massa de tecido liofilizado e o volume de água desionizada para os extratos de cada coleta foi de 30 mg de folha ou colmo e 20 mg de raízes para 4 mL de água desionizada, para as amostras da primeira coleta, e 100 mg de folha ou colmo e 50 mg de raízes para 5 mL de água desionizada para as amostras das demais coletas. Em tubos de ensaio, foram adicionados o pó liofilizado de folhas, colmos e raízes e água desionizada. As amostras foram, então, agitadas vigorosamente e incubadas a 45°C, por 1 h, em banho-maria, com agitações a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, por 10 min, sendo o sobrenadante (extrato) coletado, filtrado em papel de filtro e armazenado em frascos de vidro a -20°C.

Os teores de Na<sup>+</sup> e de K<sup>+</sup> foram determinados por fotometria de chama (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989), sendo efetuada uma leitura no fotômetro de chama para cada extrato.

Os teores de Cl<sup>-</sup> foram determinados segundo o método de Gaines, Parker e Gascho (1984). A 3,0 mL do extrato convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL da mistura

de  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$  a 13,2 mM, em metanol absoluto, e  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  a 20,2%, em água desionizada, na proporção de 4:1. Os tubos foram agitados vigorosamente e, após, 15 min, os teores de  $\text{Cl}^-$  foram estimados através de leituras de absorvância em 460 nm, utilizando-se  $\text{NaCl}$  como padrão.

O  $\text{NO}_3^-$  presente nos tecidos das plantas foi determinado através do método do ácido salicílico (CATALDO *et al.*, 1975). A 100  $\mu\text{L}$  do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de ácido salicílico a 5%, em ácido sulfúrico concentrado. Depois de 20 min em repouso, foram adicionados 9.500  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  a 2 M. Os tubos foram agitados vigorosamente e esperou-se a mistura de reação atingir a temperatura ambiente, para então se fazer as leituras de absorvância em 410 nm, utilizando-se  $\text{KNO}_3$  como padrão.

Os teores de amônio livre foram determinados pelo método do fenolato-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967). Esse método é baseado na formação do indofenol, depois da reação da amônia, fenol e hipoclorito, em pH alcalino. A 400  $\mu\text{L}$  do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 2,5 mL da solução A (fenol a 5% e nitroprussiato a 0,005%, em água desionizada) e 2,5 mL da solução B ( $\text{NaOH}$  a 0,5% e hipoclorito de sódio a 0,06%, em água desionizada). Após a adição de cada solução, os tubos foram agitados vigorosamente e, em seguida, foram incubados a 37°C, em banho-maria, por 20 min. Após esse processo, os tubos ficaram em repouso por 45 min quando, então, foram feitas as leituras de absorvância em 625 nm, utilizando-se  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como padrão.

Com exceção das determinações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , cada repetição para determinação de íons inorgânicos constou da dosagem em duplicata de cada extrato. Os teores dos íons foram expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$  e representam a média de quatro repetições.



### 3.5. Determinação dos carboidratos solúveis

Os extratos brutos utilizados para estas determinações foram os mesmos empregados para os teores de íons. Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). A 0,5 mL do extrato convenientemente diluído foram adicionados 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 10 min para o seu resfriamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos solúveis por meio de leituras de absorvância em 490 nm. A curva padrão foi obtida utilizando-se a D(+) glicose anidra. Os resultados de carboidratos solúveis foram expressos em  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS, sendo que os mesmos representaram a média de quatro repetições e cada extrato foi dosado em duplicata.

### 3.6. Determinação de compostos nitrogenados

Os extratos brutos utilizados para estas determinações foram os mesmos empregados para os teores de íons. Os teores de N-aminossolúveis foram determinados de acordo com o método de Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL do extrato bruto, convenientemente diluído, 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M, pH 5,0, 0,5 mL de cianeto de potássio (KCN) a 0,2 mM, em metilcelosolve 100% e 0,1 mL de ninhidrina a 5%, em metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a 100°C durante 20 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo (4°C). Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 0,65 mL de etanol a 60%. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorvância em 570 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de glicina.

As proteínas solúveis foram determinadas de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se o reagente do coomassie. Para um volume final de 1 L, este

reagente foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Company) em 50 mL de etanol a 95%, acrescidos de 100 mL de ácido fosfórico a 85%. O volume final da solução foi completado com água desionizada. A uma alíquota de 0,1 mL do extrato convenientemente diluído, foi adicionado 1 mL do reagente de coomassie. A mistura foi deixada em repouso por 15 min, sendo então submetidas à leitura de absorvância em 595 nm. Como padrão, foi utilizado a albumina de soro bovina.

Os resultados dos teores de N-aminossolúveis foram expressos em  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS, enquanto que os de proteínas solúveis foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  MS. Todos os resultados representaram a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

### **3.7. Determinação do nitrogênio total**

A concentração total de nitrogênio foi determinada de acordo com o método descrito por Baethgen e Alley (1989). Amostras de cerca de 50 mg de folhas, colmos e raízes foram colocadas em tubos digestores contendo 1,10 g da mistura catalisadora, composta por sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio, na proporção de 100:10:1 e 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados em um bloco digestor [Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 4025 (Piracicaba, São Paulo, Brasil)], no qual a temperatura foi elevada gradualmente até 350°C, para que se processasse a mineralização das amostras. Ao final deste processo, quando as amostras apresentavam-se como uma solução de cor verde e sem resíduos de material não digerido, o conteúdo de cada tubo digestor foi ressuspensão com água desionizada e o volume aferido para 25 mL em um balão volumétrico. Em tubos de ensaio, foi adicionado 1,0 mL da amostra digerida, convenientemente diluída, com a solução diluente (22 g da mistura catalisadora em 1,0 L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1,1 M). Em seguida, foram adicionados 5,5 mL de uma solução composta por fosfato de sódio dibásico a 0,1 M, tartarato de sódio e potássio a 5% e hidróxido de sódio (NaOH) a 5,4%, além de 4,0 mL de uma solução de salicilato de sódio a

15% e nitroprussiato de sódio a 0,03% e, por fim, 2,0 mL de hipoclorito de sódio a 0,31%. Os tubos foram agitados à medida que cada reagente foi adicionado, então, os tubos permaneceram em banho-maria a 37°C por 15 min. Os teores de nitrogênio total foram estimados através de leituras de absorbância a 650 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os resultados foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  MS e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

### **3.8. Atividades enzimáticas**

#### **3.8.1. Coleta e armazenamento do material vegetal**

As coletas das plantas ocorreram sempre no mesmo horário, entre 10 h e 30 min e 12 h e 30 min. As três folhas mais jovens completamente expandidas, a partir do ápice, e o terço distal das raízes foram retirados de cada uma das duas plantas de cada repetição. Parte desse material, no estado fresco, foi utilizado para a determinação da atividade da redutase do nitrato. O material restante foi, então, congelado imediatamente em  $\text{N}_2$  líquido e armazenado em ultrafreezer a -80 °C, para posterior utilização nos demais ensaios de atividade enzimática.

#### **3.8.2. Redutase do nitrato (NR) *in vivo***

A atividade da NR, *in vivo*, foi determinada de acordo com o método de Silveira *et al.* (1998), com pequenas modificações. Este método consiste na infiltração no tecido de uma solução contendo nitrato e na subsequente dosagem do nitrito produzido na reação, o qual se difunde no meio de incubação. Dessa maneira, amostras de aproximadamente 200 mg de discos foliares (0,5 cm de diâmetro) e 300 mg de raízes foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de incubação (tampão fosfato de potássio a 0,1 mM, pH 7,5;  $\text{KNO}_3$  a 50 mM; isopropanol a 1% (v/v); cloranfenicol a 15 mg/L). Em seguida, os tubos foram

fechados, envoltos em papel de alumínio e infiltrados à vácuo por 2 min, sendo o vácuo desfeito e novamente refeito, por mais 2 min. Após este processo, as amostras foram incubadas no escuro a 30°C, em banho-maria, por 30 min. A concentração de nitrito foi determinada colorimetricamente pela adição de 1 mL de sulfanilamida a 1% (p/v), preparada em HCl a 2,4 M, e 1 mL de *N*-naftil-etilenodiamina a 0,02% (p/v) a 2 mL do meio de incubação. A absorbância foi determinada em 540 nm, tendo como base uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de NaNO<sub>2</sub>. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ produzido} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$ .

### 3.8.3. Redutase do nitrito (NiR)

O extrato para a determinação da NiR foi preparado de acordo com Kant *et al.* (2007), com pequenas modificações. Amostras do tecido congelado de folhas ou raízes (1 g) foram maceradas em almofariz, utilizando-se N<sub>2</sub> líquido, e, em seguida, homogeneizadas com 2 mL do tampão de extração, composto por Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> a 5 mM, glicerol a 10%, ditioneitol (DTT) a 5 mM, Triton-X-100 a 0,05%, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 1 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) a 1%. O homogenato foi filtrado em tela de náilon, sendo, em seguida, centrifugado a 16.000 x g, durante 25 min, a 4°C. O precipitado foi desprezado e os extratos foliares foram submetidos a uma nova centrifugação a 16.000 x g, por 15 min, a 4°C. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4°C e o sobrenadante (extrato) foi mantido em banho de gelo até sua utilização nos ensaios enzimáticos, os quais foram realizados no mesmo dia da extração.

A atividade da NiR foi determinada de acordo com o método descrito por Datta e Sharma (1999). O meio de reação (volume final de 2 mL) foi composto de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,5, NaNO<sub>2</sub> a 2 mM, metilviologênio a 0,25 mM e 100  $\mu\text{L}$  do extrato,

sendo a reação iniciada pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de ditionito de sódio a 25 mg/mL, preparado em uma solução de  $\text{NaHCO}_3$  a 290 mM. Os tubos contendo o meio de reação foram incubados a 30°C, em banho-maria, por 30 min. Após esse período, 0,1 mL do meio de reação foi adicionado a tubos de ensaio contendo 1,9 mL de água desionizada, sendo a reação parada por agitação vigorosa dos tubos, por 10 segundos, para oxidar o ditionito de sódio remanescente. Em seguida, determinou-se a concentração de nitrito remanescente no meio de reação, em procedimento idêntico ao descrito no item 3.8.2. Como branco da reação foi utilizada a mesma mistura de reação, exceto que o extrato foi substituído por tampão de extração. A quantidade de nitrito convertida em produto (amônio) pela NiR foi estimada subtraindo-se do branco a quantidade de nitrito no meio de reação após o final do ensaio. A absorbância foi determinada em 540 nm, tendo como base uma curva padrão, utilizando-se  $\text{NaNO}_2$ . A atividade enzimática foi expressa em  $\text{nmol NO}_2^- \text{ reduzido min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína e representa a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

#### **3.8.4. Sintetase da glutamina (GS)**

Os extratos foram preparados de acordo com o método descrito por Seebauer *et al.* (2004), com pequenas modificações. Amostras de 500 mg de folhas ou raízes congeladas foram maceradas em almofariz, utilizando-se  $\text{N}_2$  líquido e, em seguida, homogeneizadas em tampão imidazol a 50 mM, pH 7,2, contendo  $\text{MgSO}_4$  a 20 mM, EDTA a 1 mM, DTT a 5 mM, PVP a 1% (p/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol a 1% (v/v). O homogenato foi filtrado em tela de náilon, sendo, em seguida, centrifugado a 10.000 x g, durante 30 min, a 4°C. O sobrenadante (extrato) resultante foi mantido em banho de gelo até a utilização nos ensaios enzimáticos, os quais foram feitos no mesmo dia da extração. Todo o procedimento foi realizado a 4°C.

A atividade da GS foi determinada de acordo com o método descrito por Rhodes, Rendon e Stewart (1975), através da formação de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato (reação “sintetase”)

a partir do glutamato e hidroxilamina (em substituição ao amônio, o substrato fisiológico). O meio de reação (volume final de 1 mL) consistiu de tampão imidazol a 100 mM, pH 7,2, glutamato a 45 mM (neutralizado com imidazol), ATP a 4,5 mM,  $MgCl_2$  a 50 mM e 100  $\mu L$  do extrato, sendo a reação iniciada pela adição de 100  $\mu L$  de hidroxilamina a 30 mM. Os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados a 30°C, em banho-maria, por 25 min. Após esse período, a reação enzimática foi parada pela adição de 250  $\mu L$  de uma solução contendo  $FeCl_3$  a 0,37 M, HCl a 0,67 N e TCA a 0,2 M. Estabelecida a cor da reação (após cerca de 10 min), as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 min. A quantidade de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formada foi determinada colorimetricamente pela leitura em 540 nm, tendo como base uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de  $\gamma$ -glutamil monohidroxamato (GMH). O branco da reação constou da mesma mistura de reação, exceto que ao invés do extrato, foram adicionados 100  $\mu L$  do tampão de extração. Os resultados foram expressos em  $nmol\ GMH.\ min^{-1}.\ mg^{-1}$  proteína e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata

### **3.8.5. Sintase do glutamato (GOGAT)**

Os extratos para esta análise foram os mesmos utilizados para a atividade da NiR. A atividade da enzima GOGAT foi determinada de acordo com o método de Nemat-Alla *et al.* (2008), através da quantificação do NADH oxidado. A mistura de reação foi composta de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,5, NADH a 1,5 mM, glutamina a 10 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato a 10 mM. A reação foi iniciada pela adição do extrato e acompanhada diretamente no espectrofotômetro pela redução da absorbância em 340 nm. A atividade foi calculada pela taxa de oxidação do NADH que foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $6,22\ mM^{-1}cm^{-1}$  para o NADH. Os resultados foram expressos em  $nmol$

NADH oxidado.min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> proteína e representam a média de quatros repetições, sendo cada amostra dosada em duplicata.

Os extratos utilizados para as determinações de atividade enzimática foram dosados quanto ao teor de proteína pelo método de Bradford (1976), descrito no item 3.6. Cada extrato foi dosado em duplicata.

### **3.9. Delineamento experimental e análise estatística**

Nos dois experimentos, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 (fontes de N) x 2 (ausência e presença de NaCl a 100 mM) x 3 (diferentes tempos de estresse salino), com quatro repetições, sendo cada uma constituída por duas plantas.

Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão das repetições de cada tratamento. Os dados foram examinados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey, com nível de significância a 5%, foi utilizado para comparar as médias entre os tratamentos controle e salino e entre as diversas fontes de nitrogênio em condições controle e de salinidade. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o SigmaStat 3.0 e para a confecção dos gráficos foi o SigmaPlot 9.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

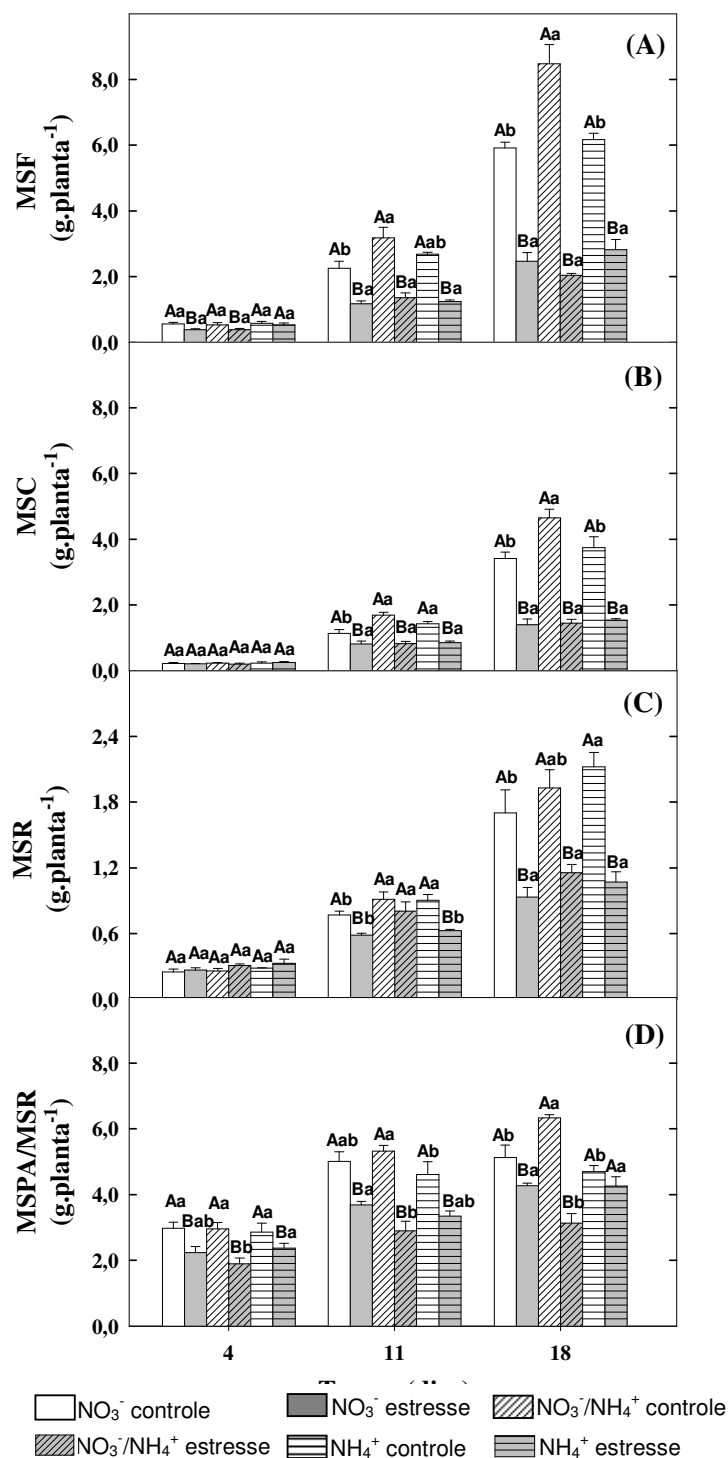
### 4.1. Crescimento vegetativo

Com o objetivo de verificar o efeito da fonte de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4^+$ ) no crescimento de plantas de milho sob condições de salinidade foram determinadas as matérias secas das folhas (MSF), dos colmos (MSC), das raízes (MSR), a relação matéria seca da parte aérea (MSPA)/MSR e a área foliar (AF). A salinidade afetou de maneira significativa todos os parâmetros de crescimento estudados (Tabela 2). Os dados de biomassa também foram afetados pelas diversas fontes de N empregadas e pela época da coleta (4, 11 e 18 dias após a imposição do estresse salino) (Tabela 2). A MSF foi mais severamente afetada pela salinidade a partir de 11 dias de exposição ao estresse (Figura 1A). Aos 4 dias, não houve diferença significativa na MSF com relação às fontes de N, porém a salinidade reduziu, em média, 30% da MSF das plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , em relação aos controles. A MSF das plantas coletadas aos 11 e 18 dias após a imposição do estresse salino foi afetada de maneira semelhante, sendo observadas severas reduções pela salinidade, principalmente nas plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , que apresentaram maior crescimento em condições controle, quando comparadas com as plantas dos outros

**Tabela 2** – Resumo da análise de variância dos parâmetros de crescimento de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (ns) = não significativo

Fonte de variação	Valores de F				
	MSF	MSC	MSR	MSPA/MSR	AF
NaCl (S)	565,4**	284,0**	72,3**	170,00**	736,3**
Fonte de N (N)	13,9**	8,5**	5,6**	1,3 <sup>ns</sup>	9,0**
Tempo (T)	840,7**	566,4**	307,6**	157,5**	729,5**
S x N	23,1**	8,2**	1,3 <sup>ns</sup>	21,4**	14,0**
S x T	228,3**	150,4**	46,2**	7,7**	264,3**
N x T	5,2**	3,2*	1,5 <sup>ns</sup>	0,8 <sup>ns</sup>	3,7**
S x N x T	13,8**	3,1*	0,5 <sup>ns</sup>	4,3**	6,3**





**Figura 1.** Matéria seca das folhas (MSF, A), dos colmos (MSC, B) e das raízes (MSR, C) e relação entre a matéria seca da parte aérea e das raízes (MSPA/MSR, D) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

tratamentos de N. A MSC comportou-se de maneira semelhante à MSF tanto em relação à salinidade quanto aos tratamentos de N a que as plantas foram submetidas (Figura 1B). As diferentes fontes de nitrogênio não exerceram nenhum efeito em reduzir os danos causados pela salinidade sobre as MSF e MSC.

A MSR foi reduzida pela salinidade somente a partir da segunda coleta e apresentou resposta aos diferentes tratamentos de N (Figura 1C). Dessa forma, a salinidade, aos 11 dias, reduziu em 23,9% e 31% o crescimento das raízes nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e com  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente, sendo que naquelas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  não houve influência do estresse. Com relação às diferentes fontes de nitrogênio, foi observada, aos 11 dias, uma maior MSR, em condições controle, nas plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e com o  $\text{NH}_4^+$ , já em condições salinas as plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  apresentaram maior crescimento. Aos 18 dias, as plantas mais afetadas pelo estresse salino foram as tratadas com  $\text{NH}_4^+$  e as menos aquelas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Por outro lado, foi observado um aumento na MSR, em condições controle, das plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  comparada com aquelas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 1C).

Estes resultados mostraram uma resposta típica de glicófitas à salinidade do meio externo tendo apresentado um significativo decréscimo da matéria seca dos diversos órgãos das plantas (LEWIS; LEIDI; LIPS, 1989; KATERJI *et al.*, 1996; AZEVEDO NETO *et al.*, 2004).

O crescimento de muitas espécies de plantas é claramente afetado pela forma de N a que as mesmas são submetidas. Além disso, trabalhos anteriores mostram que diferentes fontes de nitrogênio podem influenciar a tolerância das plantas à salinidade (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992; FRECHILLA *et al.*, 2001; DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que apenas o crescimento das raízes foi melhorado em condições de salinidade com a aplicação da mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  aos

11 dias. Contudo, Kant *et al.* (2007) observaram que em cevada a aplicação da mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  no meio de cultivo reduziu os efeitos deletérios do tratamento salino tanto na parte aérea quanto nas raízes. Esses autores sugerem que isto esteja associado a uma economia de energia, pois a energia requerida para a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  é de 20 moléculas de ATP por molécula de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto que a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  requer somente cinco moléculas de ATP por molécula de  $\text{NH}_4^+$ . Desta forma, com a aplicação da mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , mais recursos energéticos podem ser alocados para os mecanismos de tolerância ao estresse salino.

Foi observado neste trabalho, que a matéria seca das folhas e colmos, da segunda coleta, e das raízes foi reduzida pela salinidade de forma mais pronunciada nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  do que naquelas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ . Resultados semelhantes foram encontrados em diferentes espécies tais como milho, trigo, tomate, ervilha, boa noite e álamo (LEWIS; LEIDI; LIPS, 1989; MAGALHÃES; HUBER, 1989; FRECHILLA *et al.*, 2001; MISRA; GUPTA, 2006; DLUZNIIEWSKA *et al.*, 2007). Entretanto, quando o pH foi controlado, o crescimento das plantas de milho foi equivalente nos dois tipos de nutrição de N ( $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$ ) (MAGALHÃES; HUBER; TSAI, 1995).

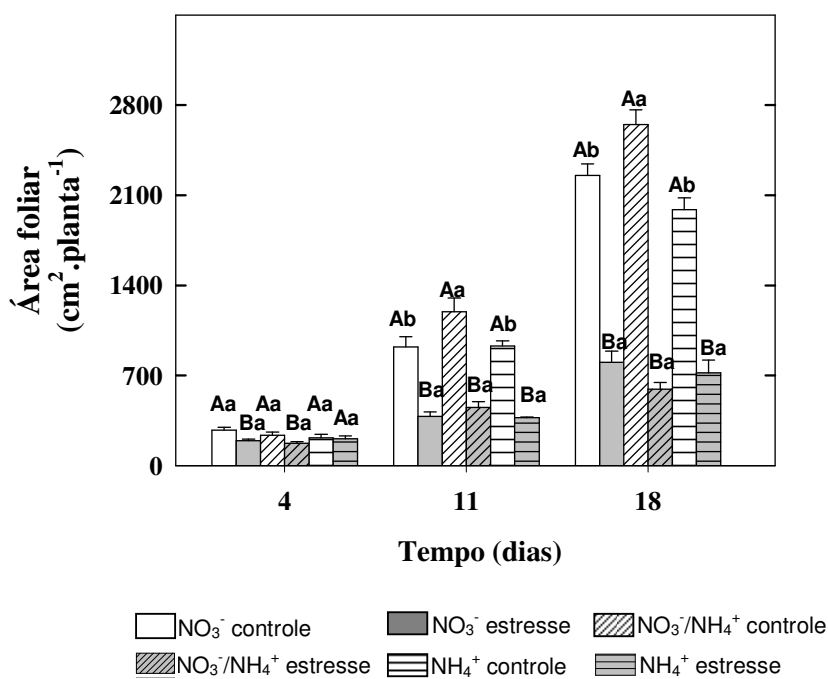
Resultados obtidos a partir de numerosos estudos sobre as respostas do crescimento das plantas à salinidade submetidas a diferentes fontes de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) são bastante variáveis. Em *Populus tremula*, por exemplo, não foi encontrado nenhum efeito relacionado à nutrição de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) na biomassa das raízes (EHLTING *et al.*, 2007). Entretanto, plantas de girassol apresentaram, sob salinidade, uma mais acentuada redução da matéria seca da parte aérea e das raízes em plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  do que com  $\text{NH}_4^+$  (ASHRAF; SULTANA, 2000).

De maneira geral, a relação MSPA/MSR foi afetada pela salinidade durante todo o período experimental e em todos os tratamentos de N (Figura 1D). As maiores reduções dessa relação, nas diferentes épocas de coleta, foram observadas nas plantas tratadas com a mistura

$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Aos 4 dias de exposição ao NaCl, foram observadas menores reduções nas plantas tratadas com o íon  $\text{NH}_4^+$ , já aos 11 dias, reduções similares foram observadas nas plantas nutridas com somente  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . Esta similaridade entre plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  foi também observada por Lewis, Leidi e Lips (1989) em plantas de milho e trigo. Entretanto, na última coleta as plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  não tiveram a relação MSPA/MSR afetada pela salinidade (Figura 1D). A maior redução, pela salinidade, da relação MSPA/MSR observada em plantas submetidas à mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  evidencia uma característica de tolerância à salinidade, já que a menor redução do crescimento das raízes pode ser atribuída a uma resposta que amplia a área de absorção de nutrientes e água, de forma a minimizar os efeitos prejudiciais do sal (FERREIRA *et al.*, 2001). Plantas de arroz, submetidas ao estresse hídrico, apresentaram um comportamento diferente. Neste caso, a relação MSPA/MSR foi reduzida pelo estresse somente nas plantas supridas com  $\text{NH}_4^+$ , sendo esta relação aumentada nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e com  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , mostrando que a nutrição com o  $\text{NH}_4^+$  aumenta a resistência do arroz ao estresse hídrico (GUO *et al.*, 2007).

A redução da relação MSPA/MSR frente à salinidade já foi observada em várias glicófitas (DEBOUBA *et al.*, 2006a; ALVAREZ PIZARRO, 2006), inclusive em plantas de milho (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004). De acordo com Munns (2002), apesar das raízes serem os tecidos da planta que estão diretamente expostos ao estresse, elas são menos vulneráveis aos sais do que a parte aérea.

A AF das plantas de milho foi reduzida pela salinidade e esta redução foi maior com o aumento do tempo de exposição ao estresse salino, independente das fontes de N a que as mesmas foram cultivadas (Figura 2). Durante os primeiros quatro dias, apenas as plantas estressadas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  mantiveram sua AF equivalente às do controle, porém as plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , tiveram a AF reduzida, em média, em 28% com a salinidade. As plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  apresentaram, aos 11 e 18



**Figura 2.** Área foliar de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

dias, maior AF em condições controle, porém, em condições salinas estas tiveram a AF mais reduzida em comparação com os outros tratamentos de N, sendo observadas reduções de 62 e 78%, respectivamente, quando comparadas com os controles (Figura 2). O declínio da área foliar é uma das respostas iniciais de glicófitas ao estresse salino, podendo ocorrer devido à inibição da divisão e expansão das células nas regiões meristemáticas (MUNNS; TERMAAT, 1986; PARIDA; DAS, 2005).

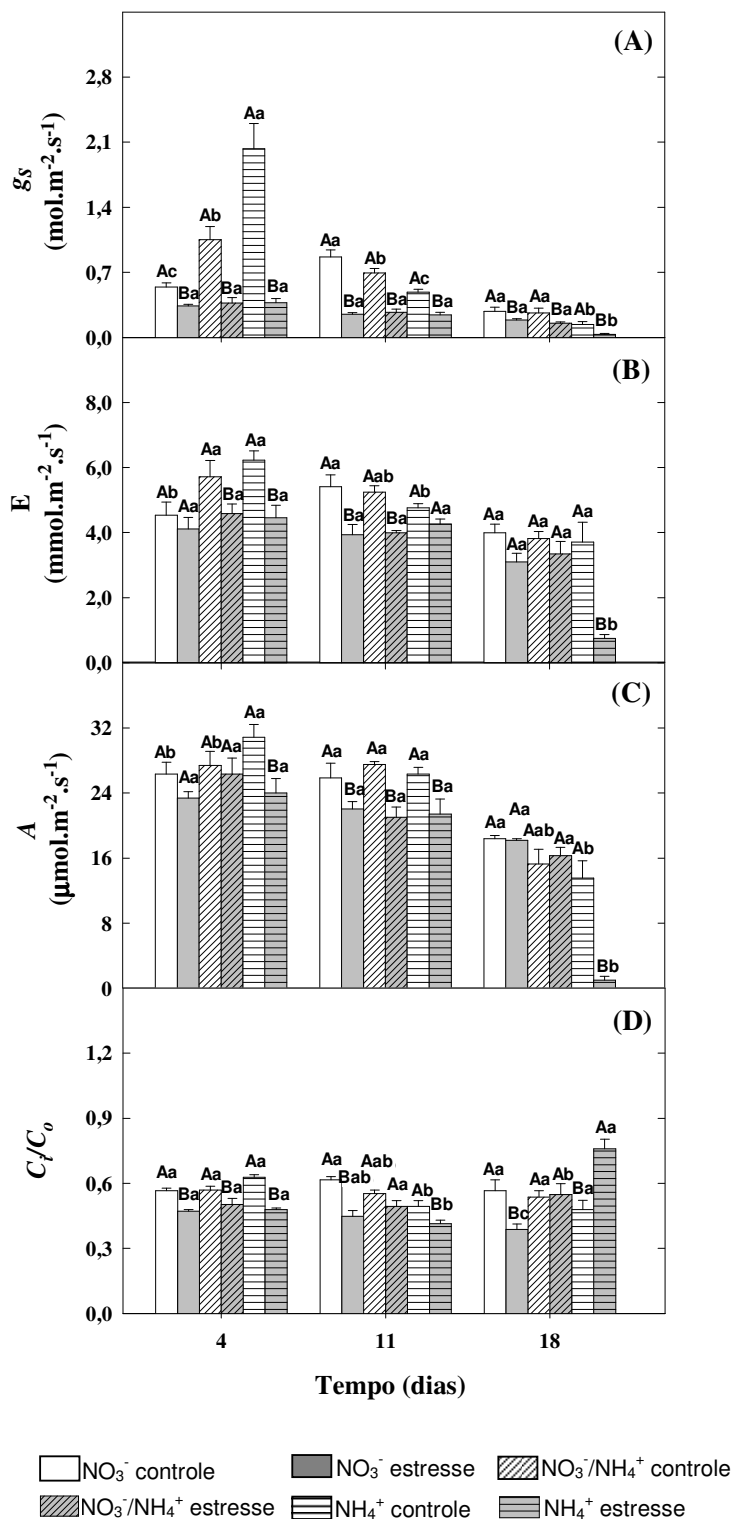
#### 4.2. Trocas gasosas

Tanto a salinidade como o tempo de coleta e a interação salinidade x fonte de nitrogênio afetaram significativamente todos os parâmetros de trocas gasosas estudados (Tabela 3). Isto mostra que o estresse salino afetou diferencialmente plantas nutridas com as diversas fontes de nitrogênio empregadas neste trabalho.

A condutância estomática ( $g_s$ ) foi afetada pela salinidade nos diversos tratamentos de N e nos diversos tempos de exposição ao NaCl. Os diferentes regimes de N, também tiveram um efeito significativo na  $g_s$  (Tabela 3; Figura 3A). Aos 4 dias de exposição ao NaCl, observou-se que, em condições controle, as plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  apresentaram uma maior  $g_s$  comparada com as dos demais tratamentos de N. Porém, em condições de salinidade

**Tabela 3** – Resumo da análise de variância dos parâmetros de trocas gasosas de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (<sup>ns</sup>) = não significativo

Fonte de variação	Valores de <i>F</i>			
	<i>A</i>	$g_s$	<i>E</i>	$C_i/C_0$
NaCl (S)	42,12**	132,53**	68,12**	20,14**
Fonte de N (N)	8,356**	8,16**	2,83 <sup>ns</sup>	2,52 <sup>ns</sup>
Tempo (T)	142,13**	79,82**	57,94**	4,41 *
S x N	9,03**	12,33**	3,33*	15,08**
S x T	0,47 <sup>ns</sup>	34,33**	0,64 <sup>ns</sup>	14,12**
N x T	14,46**	26,68**	7,87**	9,04**
S x N x T	4,33**	22,13**	4,74**	13,35**



**Figura 3.** Condutância estomática ( $g_s$ , A), transpiração ( $E$ , B), fotossíntese ( $A$ , C) e relação entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C/C_0$ , D) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

não foram observados efeitos das fontes de N sobre a  $g_s$ . Dessa maneira, os maiores efeitos da salinidade foram observados nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , onde o estresse salino reduziu este parâmetro em cerca de 82%, em relação ao controle. Na segunda coleta, o comportamento observado foi diferente, verificando-se maiores reduções pela salinidade nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , quando comparadas com as dos demais tratamentos de N. Entretanto, no período mais longo de exposição ao NaCl, a salinidade reduziu de maneira semelhante a  $g_s$  das plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , sendo essa redução de, em média, 37%, quando comparadas com os controles. As plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  como única fonte de N, sob estresse salino, apresentaram uma redução drástica (79%) da  $g_s$ , quando comparadas com o respectivo controle (Figura 3A). De acordo com Brugnoli e Lauteri (1991) o efeito primário do estresse salino é o fechamento dos estômatos, sendo as reações nos cloroplastos afetadas apenas quando vários outros processos são também afetados.

A salinidade também reduziu de maneira significativa a transpiração ( $E$ ) das plantas submetidas aos diferentes regimes de N (Tabela 3; Figura 3B). Aos 4 dias de exposição à salinidade, somente as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  não tiveram sua  $E$  reduzida pela salinidade, mesmo com uma diminuição da abertura estomática. Já aos 11 dias, isto foi observado nas plantas tratadas com o  $\text{NH}_4^+$ . A maior redução de  $E$ , cerca de 80% em relação ao controle, foi observada em plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  e aos 18 dias de imposição do estresse salino, em consequência da menor  $g_s$  também observada nessas plantas (Figura 3A e B).

A taxa fotossintética ( $A$ ) das plantas expostas ao estresse salino de curto prazo (4 dias) e nutridas com  $\text{NO}_3^-$  ou com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  não foi afetada pela salinidade (Figura 3C). Porém nas plantas submetidas à nutrição com  $\text{NH}_4^+$ , foi observada uma redução de 22% deste parâmetro pela salinidade, quando comparado ao controle. Além disso, as plantas controle deste tratamento apresentaram maior  $A$ , quando comparadas com as dos demais tratamentos



de N. Reduções similares da  $A$  pela salinidade, entre os tratamentos de N, foram observadas nas plantas expostas por 11 dias à salinidade. Porém a  $A$  não foi influenciada pelo estresse salino nas plantas expostas à salinidade por um longo período (18 dias), com exceção das nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , que tiveram sua  $A$  reduzida em 93% em comparação com o controle (Figura 3C). Apesar dos resultados dos parâmetros de crescimento dessas plantas não terem sido tão contrastantes, algumas folhas se apresentavam murchas. Como as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  ou com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (aos 4 e 18 dias de exposição à salinidade), mantiveram a  $A$  em condições de salinidade, podemos sugerir que estas plantas foram capazes de manter a  $A$  mesmo com a redução da abertura estomática. Resultado semelhante foi encontrado em plantas de tomate (KANT *et al.*, 2007). Lewis, Leidi e Lips (1989) observaram reduções drásticas em  $g_s$ ,  $E$  e  $A$ , em plantas de milho submetidas à salinidade (NaCl a 80 mM) e nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , contudo as plantas se apresentaram severamente murchas, e, segundo os autores, seria difícil relacionar esta brusca redução a apenas efeitos osmóticos e iônicos da salinidade, sendo esses efeitos secundários. Vários trabalhos têm demonstrado uma maior redução da fotossíntese em plantas submetidas a  $\text{NH}_4^+$  como única fonte de N, tanto em condições controle como de estresse salino (CLAUSSEN; LENZ, 1999; FRECHILLA *et al.*, 2001).

A relação entre as concentrações internas e externas de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_o$ ) foi afetada pela salinidade de maneira diferente dependendo do regime de N empregado (Tabela 3; Figura 3D). Aos 4 dias de exposição ao NaCl, a relação  $C_i/C_o$  foi apenas ligeiramente afetada pela salinidade, independente do tratamento de N. Contudo, não foi observada influência da salinidade na relação  $C_i/C_o$  de plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a partir de 11 dias de exposição à salinidade. O efeito negativo da salinidade na  $A$  resultou predominantemente da redução na  $g_s$ , a qual regula a pressão parcial intracelular de  $\text{CO}_2$  e a  $E$  (SEEMANN; CRITCHLEY, 1985; GUO *et al.*, 2007). As plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  e expostas ao estresse

salino de longa duração (18 dias) apresentaram um aumento na relação  $C_i/C_o$ , mostrando que a inibição drástica da  $A$  nestas plantas, pela salinidade, pode ser associada a causas tanto estomáticas, pela redução da  $g_s$ , como não-estomáticas, evidenciada pelo aumento da concentração interna de  $CO_2$ , podendo então serem devidas aos efeitos osmóticos e tóxicos decorrentes do acúmulo de íons  $Na^+$  e  $Cl^-$  nos cloroplastos (PARIDA; DAS, 2005; GUIMARÃES, 2005). Entretanto plantas de arroz, sob condições de estresse hídrico, supridas com  $NH_4^+$  apresentaram uma maior  $A$ , quando comparadas com aquelas supridas com somente  $NO_3^-$  ou com a mistura  $NO_3^-/NH_4^+$ , embora diferenças na  $g_s$  e na relação  $C_i/C_o$  não foram significativas entre todos os tratamentos de N (GUO et al., 2007).

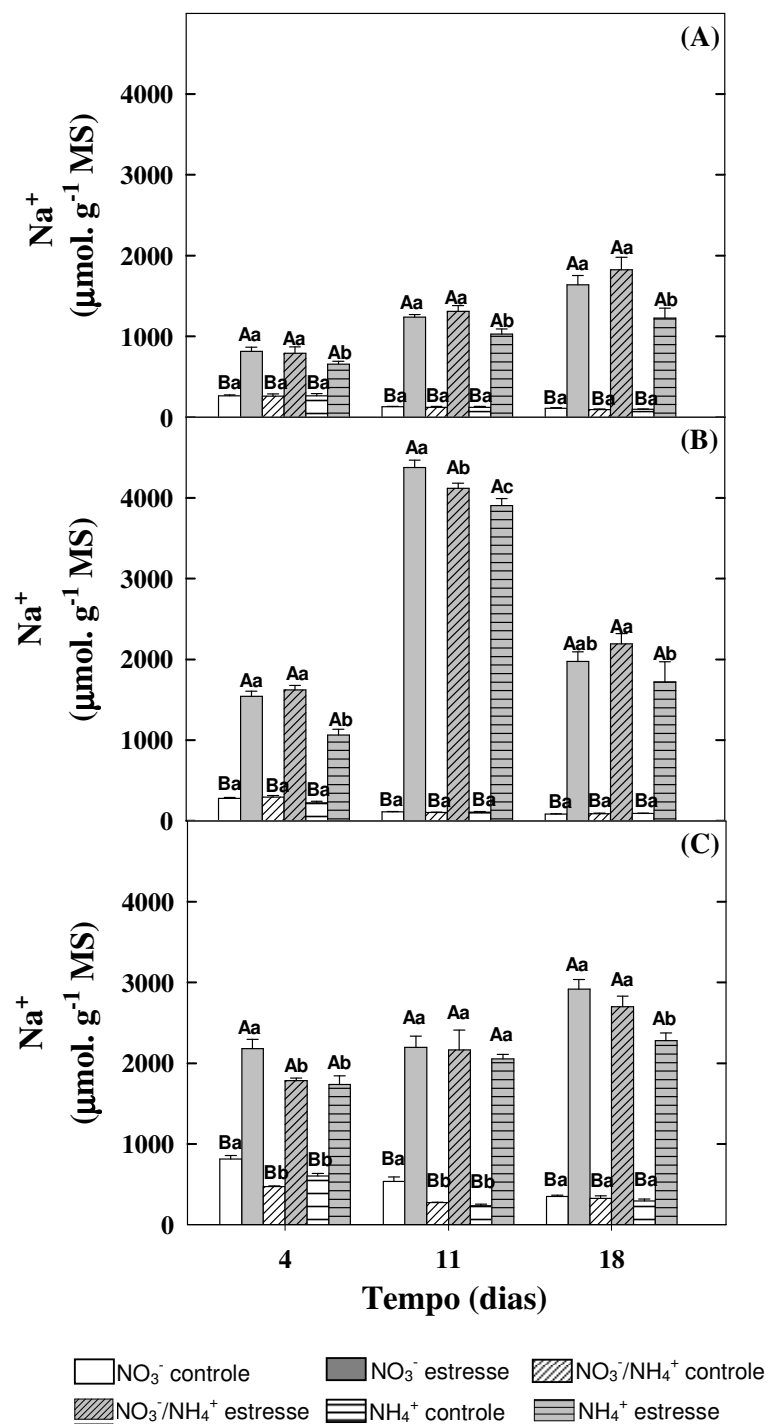
#### 4.3. Teores de íons

A salinidade, bem como a fonte de N e o tempo de coleta, afetaram a absorção e a distribuição dos cátions  $Na^+$  e  $K^+$  e a relação  $Na^+/K^+$ , nas diversas partes das plantas (Tabela 4). Exceto para os teores de  $Na^+$  nas raízes e de  $K^+$  nos colmos e raízes, houve interação significativa entre os fatores salinidade e fonte de N e salinidade e tempo de coleta para os parâmetros iônicos estudados (Tabela 4).

**Tabela 4** – Resumo da análise de variância dos teores de  $Na^+$ ,  $K^+$  e da relação  $Na^+/K^+$  de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (<sup>ns</sup>) = não significativo

Fonte de variação	Valores de $F$								
	$Na^+$			$K^+$			$Na^+/K^+$		
	Folha	Colmo	Raiz	Folha	Colmo	Raiz	Folha	Colmo	Raiz
NaCl (S)	1125,1**	3461,3**	1664,2**	497,7**	52,8**	446,3**	613,1**	1346,6**	413,5**
Fonte de N (N)	11,4**	12,8**	16,3**	51,9**	9,6**	15,2**	5,8**	5,9**	28,3**
Tempo (T)	38,5**	401,9**	11,7**	70,0**	212,6**	35,0**	60,7**	88,5**	122,9**
S x N	11,7**	10,6**	2,7 <sup>ns</sup>	8,1**	0,2 <sup>ns</sup>	0,7 <sup>ns</sup>	5,6**	4,4**	30,7**
S x T	88,2**	468,9**	46,6**	22,5**	21,8**	64,1**	78,2**	104,3**	133,6**
N x T	1,8 <sup>ns</sup>	1,5 <sup>ns</sup>	1,6 <sup>ns</sup>	1,2 <sup>ns</sup>	2,7*	10,4**	2,6*	1,0 <sup>ns</sup>	28,1**
S x N x T	1,7 <sup>ns</sup>	1,1 <sup>ns</sup>	2,0 <sup>ns</sup>	0,9 <sup>ns</sup>	6,8**	1,4 <sup>ns</sup>	2,6*	1,0 <sup>ns</sup>	26,5**

Os teores de  $\text{Na}^+$  foram consideravelmente aumentados pela salinidade em todas as partes da planta (Figura 4). Nas folhas, os teores deste íon aumentaram com o tempo de exposição ao NaCl. Além disso, durante todo o período experimental, plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  e sob estresse salino acumularam menos íons  $\text{Na}^+$  em comparação com as plantas dos demais tratamentos de N em condições de salinidade (Figura 4A). Nos colmos, os maiores aumentos nos teores do íon  $\text{Na}^+$  com a salinidade foram observados aos 11 dias de exposição à salinidade, sendo esses aumentos, em média, de 37 vezes, em relação aos controles. Este aumento de  $\text{Na}^+$  nos colmos sugere a existência de uma barreira seletiva entre as raízes e a parte aérea (SILVA, 2003). Semelhante às folhas, em todos os tempos experimentais as plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  e submetidas à salinidade, apresentaram menores concentrações de  $\text{Na}^+$  nos colmos do que as dos demais tratamentos de N nas mesmas condições (Figura 4B). Contudo, nas raízes, os teores de  $\text{Na}^+$ , comportaram-se de maneira diferente. Aos 4 dias de exposição ao NaCl, foi observado um menor acúmulo de  $\text{Na}^+$  nas plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e com  $\text{NH}_4^+$  do que aquelas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  em condições de salinidade. Aos 11 dias, o acúmulo de  $\text{Na}^+$  nas raízes não foi dependente da fonte de N, havendo semelhantes aumentos pela salinidade entre as diversas fontes de N empregadas. Aos 18 dias, foi observado um menor aumento nos teores desse íon pela salinidade nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  em comparação com os demais tratamentos de N (Figura 4C). A competição na absorção entre os íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Na}^+$  tem sido reportada por vários autores. Em azevém, uma gramínea de inverno, foi observada essa competição, observando-se redução na absorção e transporte de  $\text{Na}^+$  das raízes para a parte aérea sob nutrição com  $\text{NH}_4^+$ , tendo isso minimizado o acúmulo de  $\text{Na}^+$  nas folhas (SAGI *et al.*, 1997). Em cevada observou-se também um menor conteúdo de  $\text{Na}^+$  em folhas, caules e raízes sob regime da mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  comparado com plantas somente cultivadas na presença de  $\text{NO}_3^-$  (KANT *et al.*, 2007). Irshad,

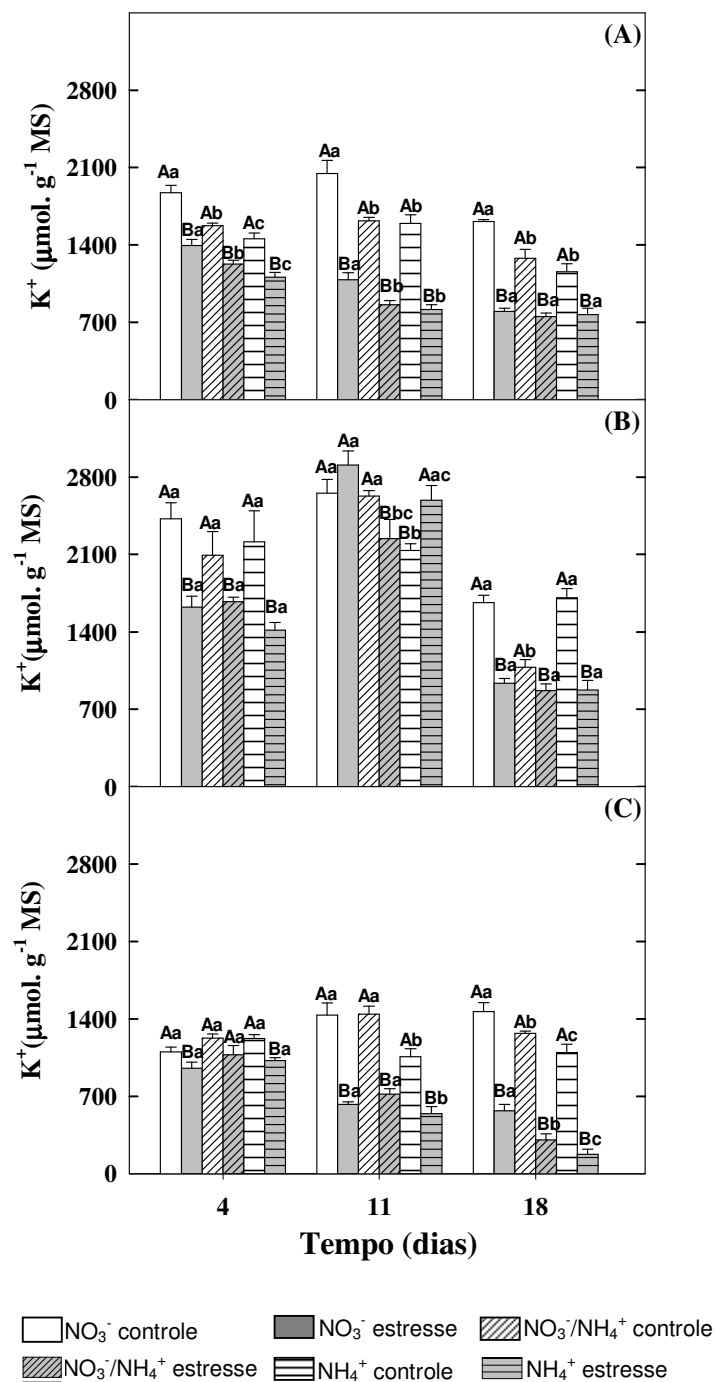


**Figura 4.** Teores de Na<sup>+</sup> em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

Eneji e Yasuda (2008) encontraram, em condições de salinidade, maiores valores de  $\text{Na}^+$  na parte aérea de plantas de milho nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e menores nas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-$ -uréia. Contudo, nas diversas partes das plantas de ervilha e trigo, a concentração de  $\text{Na}^+$  foi maior nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  (FRECHILLA *et al.*, 2001; AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001). É importante destacar, que houve um maior acúmulo de  $\text{Na}^+$  nas raízes e nos colmos do que nas folhas (Figura 4), fato que demonstra a capacidade dessa espécie em controlar o transporte deste íon para os tecidos foliares. Um maior conteúdo de  $\text{Na}^+$  nas raízes de plantas de milho submetidas à salinidade também tem sido observado por outros autores (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004; FEIJÃO, 2007),

Em contraste com o observado para o  $\text{Na}^+$ , o estresse salino reduziu os teores de  $\text{K}^+$ , em todas as partes estudadas das plantas de milho (Figura 5). Nas folhas das plantas da primeira coleta nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , houve um maior acúmulo de  $\text{K}^+$ , seguido das nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e, por fim, das tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , sendo isto observado tanto em condições controle como de salinidade (Figura 5A). Já aos 11 dias do início do tratamento salino, as plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , tanto em condições controle como de salinidade, acumularam mais  $\text{K}^+$  do que as tratadas com as outras fontes N que, por sua vez, não diferiram entre si. Aos 18 dias, o comportamento foi o mesmo, com relação aos controles, porém, na presença de NaCl, não houve diferença no acúmulo desse íon com a mudança da fonte de N (Figura 5A).

Nos colmos o efeito da fonte de N sobre o teor de  $\text{K}^+$  não seguiu um padrão consistente ao longo do período experimental (Figura 5B). No início do experimento, o acúmulo de  $\text{K}^+$  não foi dependente da fonte de N e a salinidade reduziu igualmente os teores desse íon nos diferentes tratamentos de N. Entretanto, na segunda coleta, o acúmulo de  $\text{K}^+$  nos colmos apresentou comportamento diferente frente à salinidade e foi dependente da fonte de N. Dessa forma, a adição de NaCl nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  não provocou significativas



**Figura 5.** Teores de  $K^+$  em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

mudanças no conteúdo de  $K^+$  em comparação com o controle. Contudo, nas plantas nutridas com a mistura  $NO_3^- / NH_4^+$ , a salinidade reduziu o conteúdo deste íon em 15%, em comparação com o controle, enquanto para as plantas nutridas com  $NH_4^+$  houve um aumento de 15%. As plantas nutridas com  $NH_4^+$  acumularam menos  $K^+$ , em condições controle, porém, em condições de estresse salino as plantas que menos acumularam este íon foram às nutridas com a mistura  $NO_3^- / NH_4^+$ . No final do experimento, as plantas nutridas com a mistura  $NO_3^- / NH_4^+$  acumularam menos  $K^+$  em condições controle, porém em condições de estresse salino, o acúmulo deste íon não foi dependente da fonte de N (Figura 5B). Aos 4 dias de exposição ao NaCl, o conteúdo de  $K^+$  nas raízes foi pouco reduzido pela salinidade, porém aos 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino, a salinidade reduziu severamente os teores deste íon, sendo que as plantas tratadas com  $NH_4^+$  acumularam menos este íon em comparação com as dos demais tratamentos de N, tanto em condições controle como de salinidade (Figura 5C).

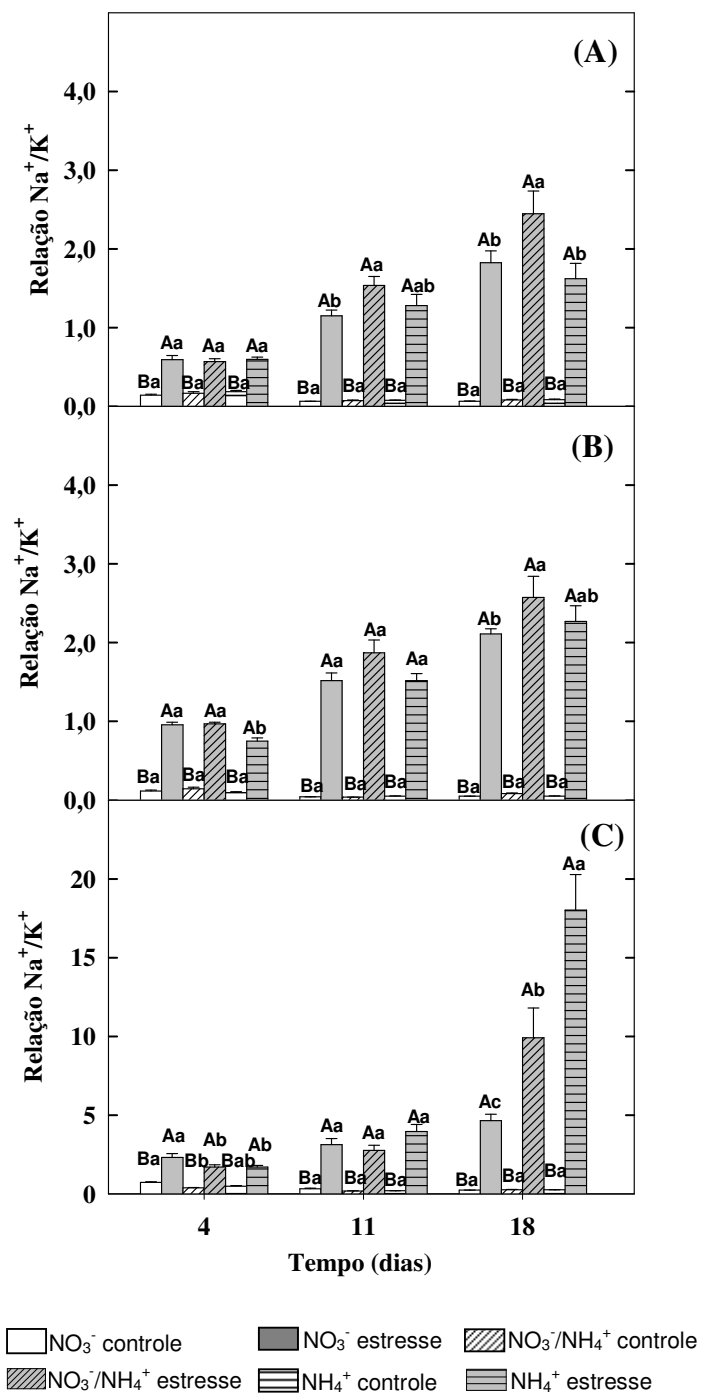
O comprometimento do estado nutricional das plantas em termos de  $K^+$  pelo aumento da absorção de  $Na^+$  é um fenômeno bastante conhecido (LIU; ZHU, 1997). De forma semelhante ao observado por outros autores o estresse salino reduziu, de modo geral, os teores de potássio nas diversas partes das plantas de milho (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004; FEIJÃO, 2007; IRSHAD, ENEJI; YASUDA, 2008). Por outro lado, Abd-El Baki *et al.* (2000) observaram reduções apenas nas raízes. A inibição na absorção de  $K^+$  pelo NaCl tem sido também observada para outras glicófitas (GOUIA; GHORBAL; TOURINE, 1994; SHABALA, 2000; ALVAREZ PIZARRO, 2006), sendo um fato prejudicial ao metabolismo, desde que este íon é essencial para a expansão celular e homeostase das plantas (SCHACHTMAN *et al.*, 1997). Possivelmente, a redução nos teores de  $K^+$  deve-se a exposição direta das raízes ao sal o que provoca alterações na integridade e permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao  $K^+$  (GRATTAN; GRIEVE, 1999). Além disso, existe

uma competição entre o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{K}^+$  pela mesma proteína transportadora localizada na membrana plasmática (NIU *et al.*, 1995).

É provável, portanto, que nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , e sob salinidade, a redução observada nos teores de  $\text{K}^+$  (Figura 5) tenha sido, principalmente, devida à competição, deste íon, com o  $\text{Na}^+$ . Porém, nas plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  ou somente com  $\text{NH}_4^+$ , mais um agente competidor pode ser acrescentado, no caso o íon  $\text{NH}_4^+$ . Alguns trabalhos demonstram que o efeito combinado da salinidade e do amônio prejudica a absorção de outros íons, tais como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , levando a um desbalanço nutricional das plantas (ASHRAF; SAULTANA, 2000; AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com os observados em azevém, trigo e ervilha, nos quais a concentração de  $\text{K}^+$  também foi reduzida em plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , tanto em condições controle como de salinidade (SAGI *et al.*, 1997; AL-MUTAWA e EL-KATONY, 2001; FRECHILLA *et al.*, 2001; IRSHAD *et al.*, 2002). Entretanto, em cevada e em *Leptochloa fusca*, ambas gramíneas, a concentração de  $\text{K}^+$  não foi influenciada pela fonte de N (MAHMOOD; KAISER, 2003; KANT *et al.*, 2007). A toxicidade encontrada em algumas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  pode estar indiretamente relacionada a uma deficiência de  $\text{K}^+$  que surge a partir da competição entre os íons  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  pelos mesmos sítios de absorção na membrana plasmática das raízes (SHAVIV *et al.*, 1990).

A relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nos diversos órgãos das plantas de milho aumentou significativamente quando as plantas foram submetidas à salinidade, sendo este aumento cada vez maior com o passar do tempo de exposição ao NaCl (Tabela 4; Figura 6). Nas folhas das plantas expostas por um curto período à salinidade (4 dias), a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  aumentou igualmente entre os diversos tratamentos de N, porém, aos 11 e 18 dias, este aumento foi mais pronunciado nas folhas das plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , quando comparadas com as das demais fontes de N (Figura 6A). Nos colmos, aos 4 dias do início da aplicação do





**Figura 6.** Relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

NaCl, a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foi aumentada, em média, cerca de 7 vezes nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  e 6 vezes nas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , quando comparadas com os controles. Com 11 dias de exposição das plantas à salinidade, a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  aumentou com a salinidade independentemente da forma de N empregada. Entretanto, no final do experimento, maiores aumentos nesta relação com a salinidade foram observados nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  ou com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , quando comparados com os respectivos controles (Figura 6B). Nas raízes, no início da imposição do estresse salino, os aumentos na relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , causados pela salinidade, foram da ordem de 2,2, 3,1 e 2,4 vezes nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente, comparados com os respectivos controles (Figura 6C). Em condições de salinidade, essa relação mostrou-se maior nas raízes das plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , quando comparada com as dos outros tratamentos de N. Aos 11 dias de imposição do estresse às plantas, a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  aumentou com a salinidade independentemente da forma de N empregada, porém, no final do experimento, o efeito da fonte de N na relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  seguiu a ordem:  $\text{NO}_3^- < \text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ < \text{NH}_4^+$  (Figura 6C). Levando-se em consideração os valores absolutos, a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foi maior nas raízes que nas outras partes da planta, especialmente no final do experimento, e isto deveu-se ao fato deste ter sido o órgão que mais acumulou  $\text{Na}^+$  e que apresentou mais reduções nos teores de  $\text{K}^+$  (Figura 5C). No final do experimento, os maiores aumentos na relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foram verificados nas folhas e nos colmos das plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , enquanto nas raízes isto aconteceu nas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  (Figura 6). Aumentos na relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  em plantas nutridas com amônio submetidas à salinidade foram observadas também em trigo e em *Leptochloa fusca* (AL-MUTAWA; EL-KATONY, 2001; MAHMOOD; KAISER, 2003).

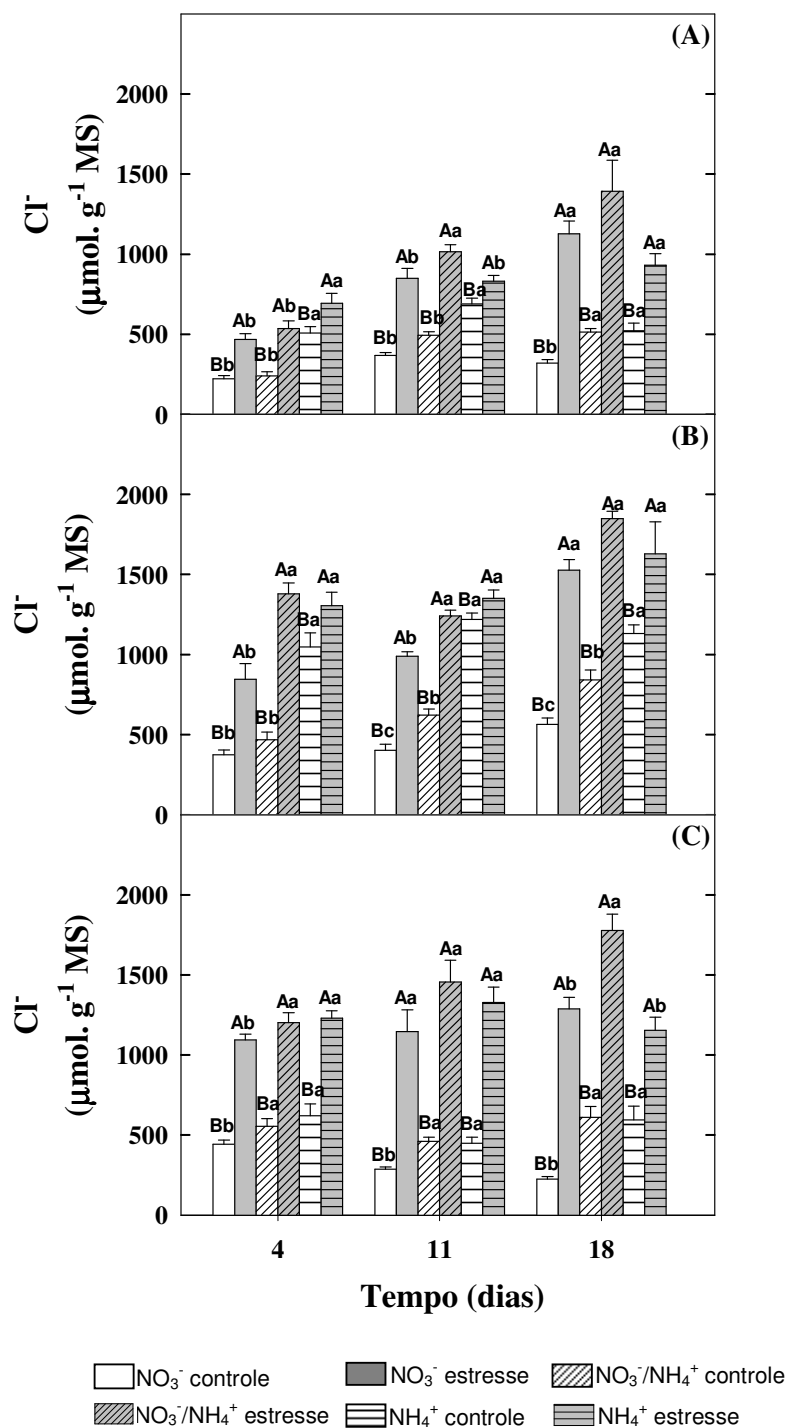
A salinidade e as diferentes fontes de N alteraram significativamente a absorção e distribuição dos ânions  $\text{Cl}^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , bem como a relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  nas diversas partes das plantas (Tabela 5). Houve interação significativa entre os fatores salinidade e fontes de N

nesses parâmetros em todos os órgãos, com exceção apenas da relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  nos colmos (Tabela 5). A salinidade aumentou consideravelmente os teores de  $\text{Cl}^-$  nas diversas partes das plantas de milho (Figura 7). Nas folhas, aos quatro dias de estresse salino observou-se aumento nos teores de  $\text{Cl}^-$ , em média, 117% nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , em comparação com os controles. Entretanto, nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , a salinidade aumentou apenas 37% o conteúdo deste íon, contudo essas plantas apresentaram maiores concentrações de  $\text{Cl}^-$  tanto em condições controle como de salinidade, quando comparados com as dos demais tratamentos de N (Figura 7A). Aos 11 dias de exposição à salinidade, foi observado que as folhas das plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , em condições de salinidade, foram as que apresentaram maiores teores de  $\text{Cl}^-$  em comparação com as cultivadas com outras fontes de N nas mesmas condições. Neste mesmo período e ao final do experimento, quando as plantas estavam expostas a 18 dias de salinidade, os maiores aumentos nos teores de  $\text{Cl}^-$  foliares, com o estresse salino, foram observados nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , seguida das nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , e, por fim, das tratadas com apenas  $\text{NH}_4^+$  (Figura 7A).

**Tabela 5** – Resumo da análise de variância dos teores de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e da relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (<sup>ns</sup>) = não significativo

Fonte de variação	Valores de <i>F</i>								
	$\text{Cl}^-$			$\text{NO}_3^-$			$\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$		
	Folha	Colmo	Raiz	Folha	Colmo	Raiz	Folha	Colmo	Raiz
NaCl (S)	234,3**	329,0**	44,0**	357,7**	254,2**	14,2**	90,6**	10,4**	25,8**
Fonte de N (N)	10,1**	74,7**	25,3**	787,2**	471,7**	750,6**	520,7**	249,2**	39,6**
Tempo (T)	54,5**	42,3**	3,6*	58,1**	1,4 <sup>ns</sup>	78,2**	84,3**	28,2**	17,8**
S x N	11,7**	23,8**	6,1**	117,9**	66,1**	9,1**	4,3*	2,6 <sup>ns</sup>	22,7**
S x T	21,9**	11,4**	9,8**	14,5**	22,6**	7,7**	20,9**	8,5**	14,8**
N x T	6,5**	3,2*	5,1**	19,4**	6,2**	11,8**	35,8**	26,4**	17,2**
S x N x T	1,5 <sup>ns</sup>	1,4 <sup>ns</sup>	3,7*	4,1**	9,6**	7,4**	2,3 <sup>ns</sup>	7,1**	14,7**

Nos colmos, aos quatro dias após o início do tratamento com NaCl, foram observados maiores aumentos nos teores de  $\text{Cl}^-$  nas plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$



**Figura 7.** Teores de Cl<sup>-</sup> em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

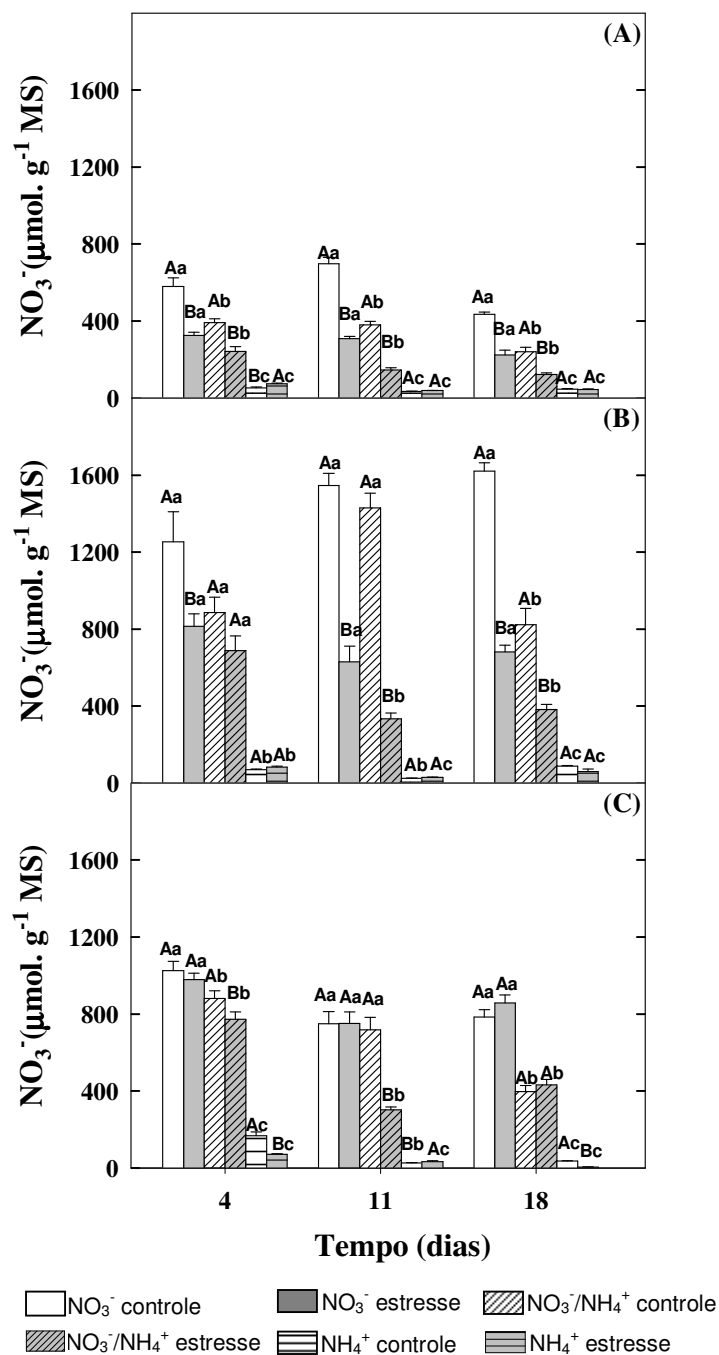
(194%), porém, aos 11 e 18 dias, os maiores aumentos foram observados nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , sendo estes aumentos de 146% e 170%, respectivamente, comparados com os controles (Figura 7B). Nas raízes, foi observado que a salinidade aumentou, de forma mais acentuada, os teores de  $\text{Cl}^-$  nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , seguida das nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e, finalmente, das tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , em comparação com os respectivos controles. Entretanto, em condições controle, durante todo o experimento, e em condições de salinidade, aos 4 dias do início do tratamento salino, as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  apresentaram menores teores de  $\text{Cl}^-$ , quando comparadas com os outros tratamentos de N nas mesmas condições (Figura 7C).

O acúmulo de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  em plantas submetidas ao estresse salino tem um efeito negativo no metabolismo destas plantas (MUNNS; TERMAAT, 1986). Dessa forma, a toxicidade do  $\text{Cl}^-$  pode explicar, pelo menos em parte, a observada redução no crescimento. A nutrição com  $\text{NH}_4^+$  comparada com aquela com  $\text{NO}_3^-$  aumentou a concentração de  $\text{Cl}^-$  tanto na parte aérea, quanto nas raízes. Em geral, a nutrição por amônio causa um aumento na concentração de ânions, entre os quais, o  $\text{Cl}^-$  (SAGI et al., 1997; MAHMOOD; KAISER, 2003). Este desbalanceamento foi relatado em outras espécies, tais como ervilha (FRECHILLA et al., 2001) e *Leptochloa fusca* (MAHMOOD; KAISER, 2003). Quando essas plantas foram nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , os teores de  $\text{Cl}^-$  foram bastante elevados, porém, os efeitos da salinidade nos teores desse íon foram menores do que em plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ . Entretanto, em plantas de soja não foi encontrada nenhuma substituição parcial de  $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$  e nenhum efeito sinérgico entre  $\text{NH}_4^+/\text{Cl}^-$  (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992).

Em termos quantitativos, os íons  $\text{Cl}^-$  acumularam-se mais nas raízes e colmos, que nas folhas, evidenciando a capacidade das plantas de milho de limitar o transporte de íons aos tecidos foliares. O controle do transporte de íons (principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) por intermédio

das raízes tem sido proposto como uma característica de tolerância particularmente importante em glicófitas (MUNNS, 2002). Esse controle envolve processos que minimizam o transporte de sais das raízes para a parte aérea ou que maximizam sua absorção no xilema radicular e caulinar (PARANYCHIANAKIS; CHARTZOULAKIS, 2005).

Os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram reduzidos pela salinidade nos diversos órgãos das plantas cultivadas em presença de  $\text{NO}_3^-$  ou com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , sendo observado pouco efeito da salinidade nas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  (Figura 8). De maneira geral, independente do órgão e do tempo de exposição à salinidade pode-se observar que as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  apresentaram maiores concentrações deste íon, tanto em condições controle quanto de estresse salino, seguida das tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e, por fim, das tratadas com somente  $\text{NH}_4^+$  que, como era esperado, apresentaram baixíssimas concentrações deste íon. Nas folhas, a salinidade reduziu os teores de  $\text{NO}_3^-$  de maneira semelhante, nas plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  ou com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , durante todo o período experimental, sendo essas reduções, em média, de 41%, 59% e 49% aos 4, 11 e 18 dias do início da exposição à salinidade, quando comparado com os controles (Figura 8A). Nos colmos, no início do experimento, a salinidade reduziu os teores de  $\text{NO}_3^-$  apenas nas plantas tratadas com este íon, sendo essa redução de 35%, quando comparada ao controle. Entretanto, aos 11 dias do início da exposição ao NaCl, as plantas cujos os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram mais afetadas pela salinidade foram as do tratamento  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Ao final do experimento, a salinidade reduziu de forma semelhante os teores de  $\text{NO}_3^-$  nos colmos, entre as plantas cultivadas com as duas fontes ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ), sendo, em média de 56% essa redução em comparação com os controles (Figura 8B). Nas raízes, foi observado um comportamento diferente, pois durante todo o período experimental, a salinidade não interferiu nos teores de  $\text{NO}_3^-$  das plantas nutridas com este íon. Contudo, nas plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  a salinidade interferiu nos teores de  $\text{NO}_3^-$  até 11 dias depois da exposição ao NaCl (Figura 8C). A redução da

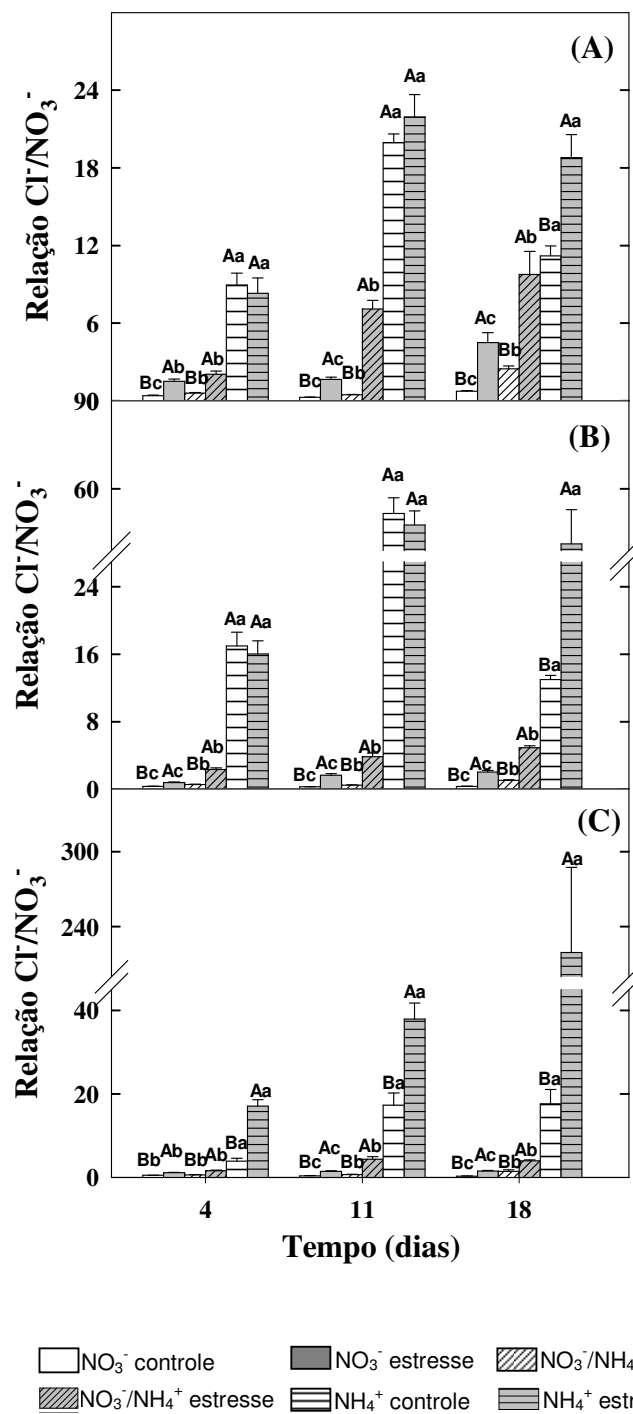


**Figura 8.** Teores de  $\text{NO}_3^-$  em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

concentração de  $\text{NO}_3^-$  em decorrência do tratamento salino pode ser atribuída à perda da integridade das membranas radiculares (CARVAJAL; MARTINEZ; ALCARAZ, 1999), a uma inibição da absorção de  $\text{NO}_3^-$  (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992; PARIDA; DAS, 2004) ou a um menor carregamento de  $\text{NO}_3^-$  através do xilema radicular (ABD-EL BAKI *et al*, 2000). O decréscimo da concentração de  $\text{NO}_3^-$ , principalmente nas folhas e nos colmos, pode ser atribuída à competição entre o  $\text{Cl}^-$  e o  $\text{NO}_3^-$  pelos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (DEANE-DRUMOND, 1986) e/ou a uma inativação dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  causada pelos efeitos tóxicos do estresse salino (LIN; SANDRA; SCHUMAKER, 1997).

A relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  foi aumentada pela salinidade nas diversas partes das plantas, independente da fonte de N empregada (Figura 9). De maneira geral, durante todo o período experimental e em todos os órgãos das plantas de milho, foi observado que esta relação aumentava gradativamente com a redução da concentração do  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva. Dessa forma, tanto em condições controle como de salinidade, menores valores da relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  foram encontradas nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  comparadas com aquelas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  como única fonte de N. Nas folhas, a relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  aumentou com a salinidade de forma semelhante nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Comparando-se com os controles, foram observados aumentos médios de 2,6 e 3,8 vezes, aos 4 e 11 dias de exposição ao estresse salino, respectivamente (Figura 9A). Ao final do experimento, foi observado que a salinidade também aumentou os valores dessa relação nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ . Nos colmos, até 11 dias do início do tratamento salino, as plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  apresentaram maiores aumentos da relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$  frente à salinidade (Figura 9B). De maneira semelhante às folhas, aos 18 dias, foram observados aumentos significativos, nesta relação, de cerca de duas vezes com a imposição do estresse salino nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  (Figura 9B). As raízes apresentaram um comportamento





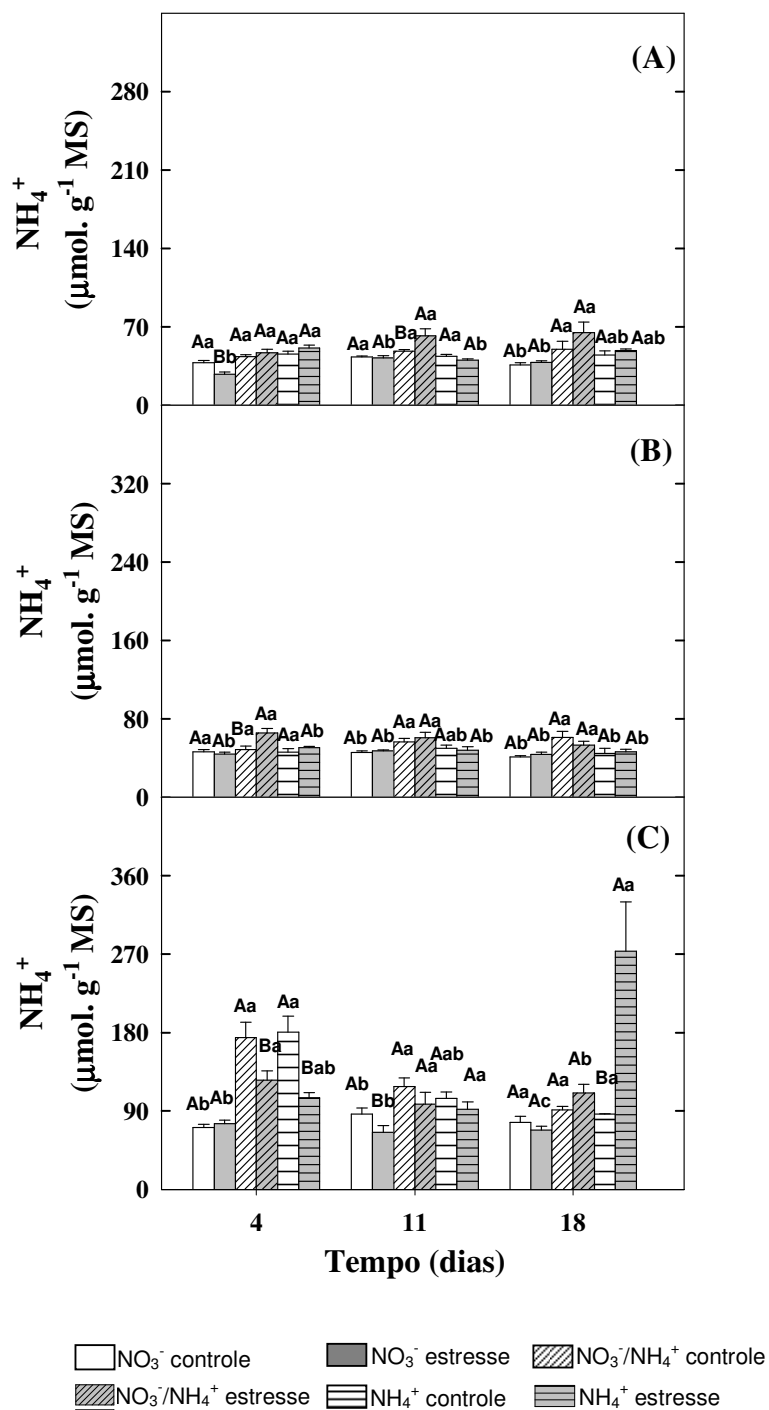
**Figura 9.** Relação Cl<sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

diferente, pois durante todo o período experimental foi observado aumentos significativos, na relação  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ , com o estresse salino independentemente da fonte de N empregada (Figura 9C). Estes resultados sugerem que o aumento da concentração de  $\text{NO}_3^-$  no meio de cultivo reduz a absorção e o acúmulo de  $\text{Cl}^-$  (FEIJÃO, 2007).

A salinidade não afetou significativamente os teores de  $\text{NH}_4^+$  das plantas de milho, porém as diferentes fontes de N foram capazes de alterar a absorção e distribuição deste íon (Tabela 6). A interação salinidade *versus* fonte de N também foi significativa, exceto nos colmos, mostrando que os teores de  $\text{NH}_4^+$  comportaram-se diferentemente entre as diversas fontes de N em condições controle e de salinidade. De modo geral, nas plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4^+$  foram encontradas maiores quantidades do íon  $\text{NH}_4^+$ , tanto em condições controle como de salinidade (Figura 10). Nas folhas e nos colmos, foram observadas poucas mudanças na concentração de  $\text{NH}_4^+$  ao longo do período experimental e com a salinidade (Figura 10A e B). Entretanto, nas raízes foi observado comportamento diferente, sendo possível observar mudanças mais evidentes com a imposição do estresse salino e com a fonte de N a que as plantas foram submetidas (Figura 10C). Aos 4 dias do início do tratamento salino, foi observada uma maior redução, pela salinidade, nos teores de  $\text{NH}_4^+$  nas plantas nutridas apenas com este íon, contudo não foi observada reduções nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ . Redução da absorção de  $\text{NH}_4^+$  sob condições de salinidade foi

**Tabela 6** – Resumo da análise de variância dos teores de  $\text{NH}_4^+$  de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*\*) e (\*\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (ns) = não significativo

Fonte de variação	Valores de F		
	$\text{NH}_4^+$		
	Folha	Colmo	Raiz
NaCl (S)	3,4 <sup>ns</sup>	1,9 <sup>ns</sup>	0,2 <sup>ns</sup>
Fonte de N (N)	24,7 <sup>**</sup>	24,6 <sup>**</sup>	40,8 <sup>**</sup>
Tempo (T)	3,3 <sup>*</sup>	1,2 <sup>ns</sup>	8,0 <sup>**</sup>
S x N	5,1 <sup>**</sup>	0,5 <sup>ns</sup>	6,3 <sup>**</sup>
S x T	1,5 <sup>ns</sup>	2,0 <sup>ns</sup>	27,7 <sup>**</sup>
N x T	3,9 <sup>**</sup>	0,1 <sup>ns</sup>	10,0 <sup>**</sup>
S x N x T	1,1 <sup>ns</sup>	2,9 <sup>*</sup>	15,9 <sup>**</sup>



**Figura 10.** Teores de amônio em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

também observada em trigo (HAWKINS; LEWIS, 1993). A inibição da absorção do íon amônio pela salinidade pode ser devida à competição direta com o sódio e/ou à despolarização da membrana plasmática causada pelas altas concentrações de NaCl (HAWKINS; LEWIS, 1993). Aos 18 dias de exposição ao NaCl, foi verificado, nas raízes, que apenas as plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  tiveram os teores deste íon alterados pela salinidade, sendo observado um aumento de 217% em comparação com o controle. Em plantas de soja, a salinidade aumentou os teores de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas e nas raízes das plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , porém nas raízes das plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  foi observado um grande aumento deste íon tanto em condições controle como de salinidade, comparando-se com os dos demais tratamentos de N (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992). Em tomate, a salinidade também aumentou a concentração de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas, mas não nas raízes (DEBOUBA *et al.*, 2007). Entretanto, em *Leptochloa fusca*, a concentração de  $\text{NH}_4^+$  permaneceu baixa em todos os tratamentos (MAHMOOD; KAISER, 2003). A menor concentração de  $\text{NH}_4^+$ , observada na parte aérea, deve-se ao fato desse íon não ser transportado via xilema tendo, dessa maneira, que ser assimilado nas raízes. Assim, o  $\text{NH}_4^+$ , nas folhas, é produzido por redução do nitrato, por desaminação de aminoácidos e pela fotorrespiração (MIFLIN; LEA, 1976).

#### 4.4. Carboidratos solúveis

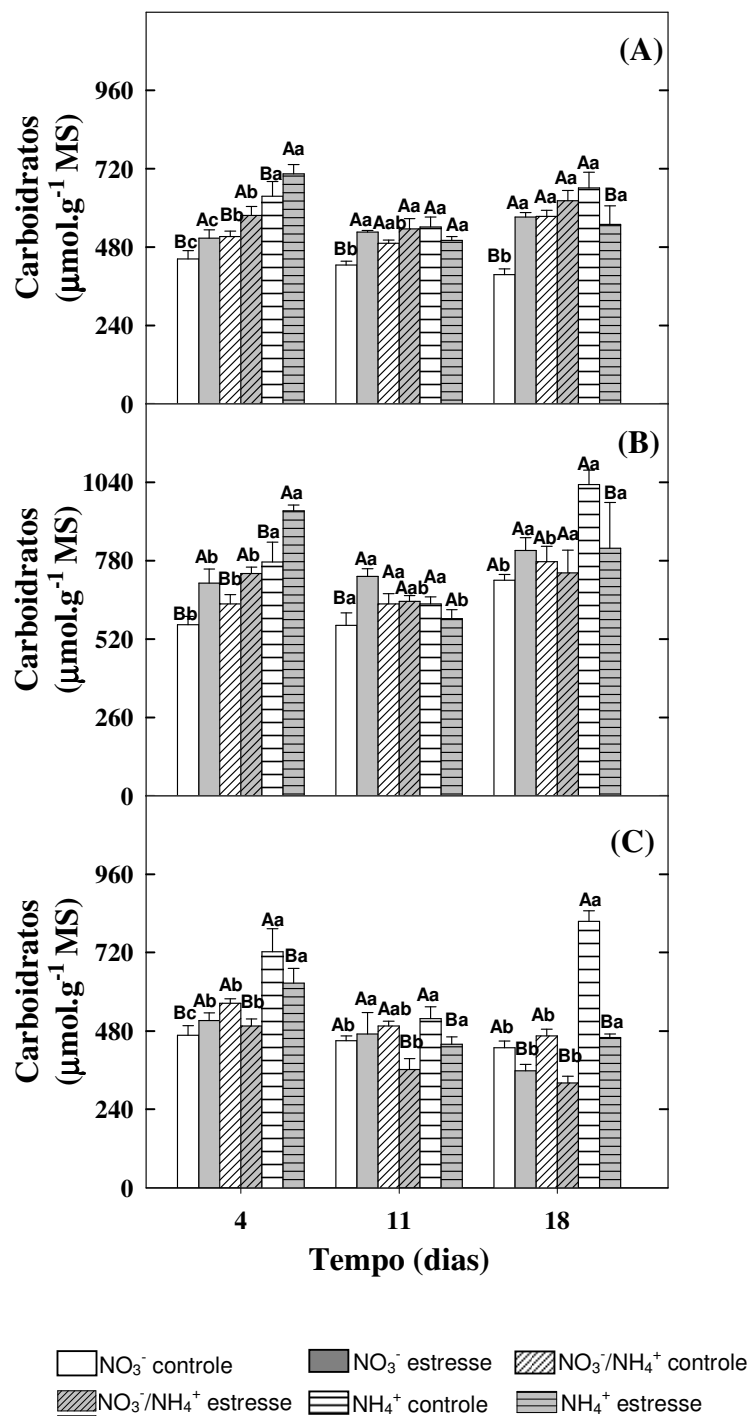
Os teores de carboidratos solúveis foram alterados significativamente pela salinidade nas folhas e nas raízes e foram dependentes da fonte de N empregada e do tempo de coleta em todas as partes estudadas das plantas de milho (Tabela 7). A figura 11 mostra os efeitos da salinidade e das diferentes fontes N nos teores de carboidratos. Nas folhas, aos 4 dias do início do tratamento salino, foi observado um aumento nos teores de carboidratos em todos os tratamentos de N quando as plantas foram submetidas à salinidade (Figura 11A). Os mais elevados teores de carboidratos foram observados nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , seguidas

das nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e, por conseguinte, as que menos acumularam esses solutos orgânicos foram as tratadas somente com  $\text{NO}_3^-$ . Aos 11 e 18 dias, a salinidade interferiu nos teores de carboidratos nas folhas das plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , sendo observados aumentos de 23% e 45%, respectivamente, em comparação com os controles e naquelas do tratamento apenas com  $\text{NH}_4^+$ , aos 18 dias, causando redução de 17% em relação ao controle. Neste período foram observadas menores concentrações de carboidratos solúveis nas folhas das plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , em condições controle, quando comparadas com as dos demais tratamentos de N (Figura 11A).

**Tabela 7** – Resumo da análise de variância dos teores de carboidratos solúveis de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (ns) = não significativo

Fonte de variação	Valores de <i>F</i>		
	Carboidratos		
	Folha	Colmo	Raiz
NaCl (S)	11,8**	2,9 <sup>ns</sup>	44,9**
Fonte de N (N)	27,5**	8,9**	45,5**
Tempo (T)	8,8**	18,1**	21,0**
S x N	9,3**	3,7*	12,3**
S x T	0,5 <sup>ns</sup>	4,6*	10,1**
N x T	4,8**	3,9**	8,5**
S x N x T	3,4*	1,5 <sup>ns</sup>	2,6*

Nos colmos, foram observados aumentos nos teores de carboidratos em todos os tratamentos de N, porém apenas no início do experimento, sendo os maiores aumentos observados (23%, em média) nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , em comparação com os controles (Figura 11B). Além disso, nesse mesmo período, foram observados mais elevados teores de carboidratos nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  comparadas com os demais tratamentos de N, em condições tanto salinas, quanto controle. Aos 11 dias do início do tratamento salino, foi observado apenas um aumento com a salinidade nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ . No entanto, ao final do experimento, as plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  apresentaram reduções nos



**Figura 11.** Teores de carboidratos em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

teores de carboidratos solúveis pela salinidade. Enquanto que na parte aérea foram observados, principalmente, aumentos nos teores de carboidratos solúveis com a salinidade, nas raízes foram encontradas, fundamentalmente, reduções com esse estresse (Figura 11). Nas raízes, os maiores conteúdos de carboidratos foram constatados nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  (Figura 11C).

O acúmulo de carboidratos solúveis em plantas estressadas tanto por sais como pela seca tem sido bastante relatado. Azevedo Neto *et al.* (2004) encontraram aumentos nos teores de carboidratos solúveis em folhas de plantas de milho. Kerepesi e Galiba (2000), trabalhando com quatro genótipos de trigo, observaram que os mais tolerantes à salinidade foram os que mais acumularam carboidratos solúveis.

Em *Leptochloa fusca*, o conteúdo de amido nas raízes foi maior em plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  do que naquelas com  $\text{NO}_3^-$ , porém a concentração de açúcar solúvel não foi afetada pela forma de N (MAHMOOD; KAISER, 2003). Frechilla *et al.* (2001) demonstraram que o conteúdo de carboidratos nas raízes foi reduzido pela salinidade em ambos os tipos de nutrição de N ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ), enquanto que na parte aérea os teores de carboidratos foram aumentados com a salinidade nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ . Contudo, esses autores, não encontraram efeito da fonte de N nos conteúdos de carboidratos na parte aérea e nas raízes de plantas de ervilha.

Plantas que crescem em meio com  $\text{NH}_4^+$  devem evitar o efeito tóxico deste íon, dessa forma, o  $\text{NH}_4^+$  deve ser assimilado em compostos orgânicos, um processo que requer um alto suprimento de carboidratos a partir da parte aérea para as raízes, com a finalidade de fornecer esqueletos carbônicos para a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  (LIPS *et al.*, 1990).

#### **4.5. Compostos nitrogenados**

Tanto a salinidade, como as diferentes fontes de N interferiram de forma significativa nos conteúdos de proteínas solúveis e N-aminossolúveis, exceto para o caso dos N-

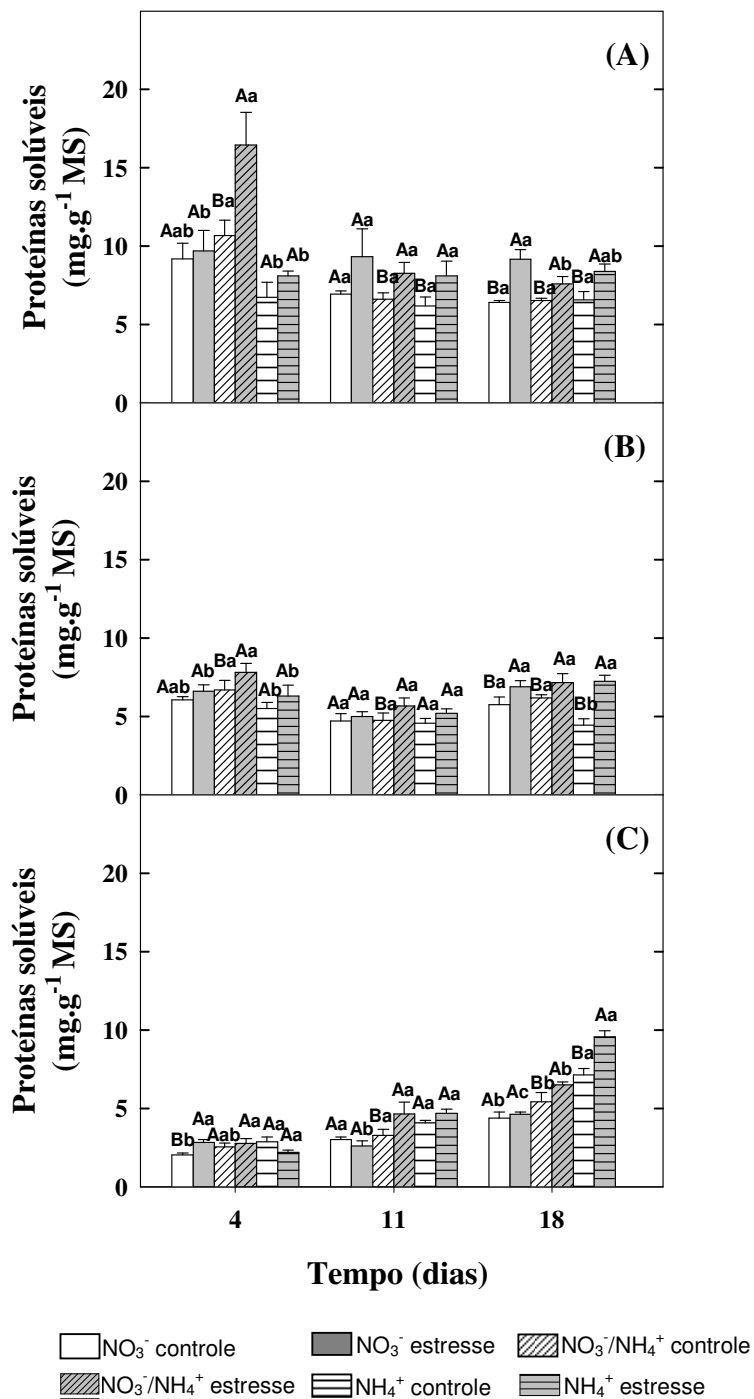
aminossolúveis nas raízes, que não foram afetados significativamente pela salinidade (Tabela 8). Esses conteúdos também foram influenciados pelo tempo, com exceção dos N-aminossolúveis das folhas. Contudo, a interação salinidade e fonte de nitrogênio foi significativa apenas para os teores de N-aminossolúveis nas folhas (Tabela 8).

**Tabela 8** – Resumo da análise de variância dos teores de proteínas solúveis e N-aminossolúveis de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (ns) = não significativo

Fonte de variação	Valores de <i>F</i>					
	Proteínas solúveis			N-aminossolúveis		
	Folha	Colmo	Raiz	Folha	Colmo	Raiz
NaCl (S)	21,2**	24,1**	19,8**	14,6**	53,9**	2,9 <sup>ns</sup>
Fonte de N (N)	9,3**	5,5**	56,7**	34,9**	79,0**	111,3**
Tempo (T)	31,4**	20,5**	245,4**	2,2 <sup>ns</sup>	5,4**	3,5*
S x N	0,8 <sup>ns</sup>	1,1 <sup>ns</sup>	2,3 <sup>ns</sup>	3,9*	1,4 <sup>ns</sup>	0,4 <sup>ns</sup>
S x T	0,3 <sup>ns</sup>	2,2 <sup>ns</sup>	5,6**	6,7**	2,3 <sup>ns</sup>	8,0**
N x T	10,9**	0,7 <sup>ns</sup>	21,3**	0,5 <sup>ns</sup>	2,4 <sup>ns</sup>	1,5 <sup>ns</sup>
S x N x T	2,9*	0,9 <sup>ns</sup>	6,0**	0,6 <sup>ns</sup>	1,1 <sup>ns</sup>	5,9**

A figura 12 mostra o efeito da salinidade e dos diferentes regimes de N nos teores de proteínas solúveis de folhas, colmos e raízes de plantas de milho. A salinidade, de maneira geral, aumentou os teores de proteínas solúveis nas diversas partes da planta e nos diferentes tratamentos de N (Figura 12). Nas folhas, aos 4 dias do início do tratamento salino, a adição do NaCl no meio de cultivo afetou os teores de proteínas solúveis apenas das plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , sendo observado um aumento de 54% nestes teores, em comparação com o controle (Figura 12A). Nestas plantas, também foram observadas as maiores concentrações de proteínas solúveis, em condições de salinidade, quando comparadas com as dos demais tratamentos de N. Aos 11 dias, a salinidade aumentou os teores de proteínas solúveis independentemente da fonte de N a que a planta foi submetida. Ao final do experimento, foi observado que os teores de proteínas nas folhas aumentaram mais com a salinidade nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , sendo este aumento de 43% em relação ao controle (Figura 12A). Nos colmos, aos 4 e 11 dias de exposição ao NaCl, a salinidade interferiu nos



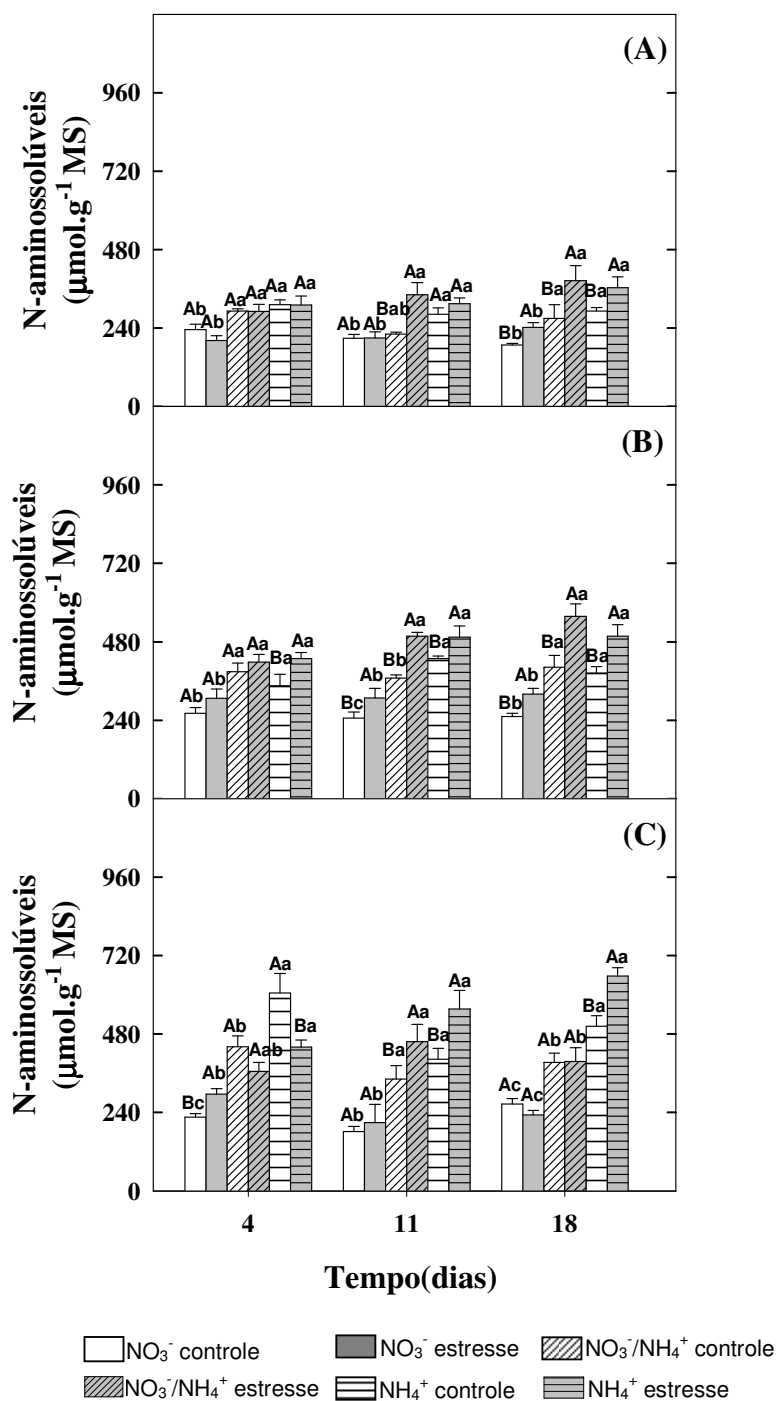


**Figura 12.** Teores de proteínas solúveis em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

conteúdos de proteínas solúveis apenas nas plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , apresentando um aumento médio de 18% em relação ao controle (Figura 12B). Aos 18 dias, a salinidade interferiu em todos os tratamentos de N, sendo o mais elevado aumento (63%) observado nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$ . Nas raízes, foi observado um comportamento diferente, pois, aos 18 dias do início do tratamento salino, puderam-se verificar diferenças mais conspícuas entre os diferentes tratamentos de N (Figura 12C). Em condições salinas, as concentrações de proteínas foram crescentes a partir do tratamento com  $\text{NO}_3^-$ , seguidas do tratamento com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e as maiores quantidades foram encontradas nas nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , sendo que nestas plantas essa condição também foi verificada em meio não salino. Neste trabalho, não foi possível relacionar o teor de proteínas solúveis e as diferentes fontes de N na parte aérea, porém nas raízes expostas a um longo período de estresse salino foi possível verificar esta relação.

Em soja, os teores de proteínas solúveis foram reduzidos pela salinidade e não foi encontrada nenhuma relação entre a concentração de proteínas e as diferentes fontes de N (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992). Contudo, em *Populus canescens*, a concentração de proteínas aumentou com a salinidade nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e diminuiu nas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  (DLUZNIEWSKA *et al.*, 2007). Por outro lado, Kant *et al.* (2007) não encontraram nenhum efeito da salinidade e nem das diferentes fonte de N sobre os teores de proteínas solúveis em plantas de cevada. É comum a salinidade influenciar a concentração de proteínas solúveis, podendo reduzir ou aumentar em resposta a este estresse. Em plantas de milho submetidas a 150 mM de NaCl, as concentrações de proteínas solúveis totais foram aumentadas pela salinidade nas folhas, porém foram pouco afetadas nas raízes (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000).

De maneira geral, os teores de N-aminossolúveis foram aumentados pela adição de NaCl no meio de cultivo (Figura 13). Nas folhas, isto foi observado nas plantas nutridas com



**Figura 13.** Teores de N-aminosolúveis em folhas (A), colmos (B) e raízes (C) de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Para cada tempo, colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúscula nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , aos 11 dias do início do tratamento salino, e em todos os tratamentos de N, no final do experimento, sendo o maior aumento (43%) observado nas plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , com relação ao respectivo controle (Figura 13A). Nos colmos, diferentemente das folhas, a influência da salinidade nos teores de N-aminossolúveis em todos os tratamentos de N foi observada aos 11 e 18 dias do início do tratamento salino, sendo novamente as plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  as que apresentaram maior incremento destes solutos quando comparadas com as dos demais tratamentos de N (Figura 13B). Com relação às raízes, as diferenças entre os tratamentos de N foram bastante nítidas, sendo os menores valores encontrados nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  comparadas com as plantas dos demais tratamentos de N. O maior teor de N-aminossolúveis foi encontrado nas plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , ao final do experimento (Figura 13C).

Nas diversas partes das plantas e durante todo o período experimental, os teores de N-aminossolúveis foram maiores nas plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e com apenas  $\text{NH}_4^+$ , tanto em condições controle como de salinidade. Além disso, esses teores distribuíram-se diferentemente nas diversas partes das plantas, sendo encontrados em maiores quantidades nas raízes e colmos do que nas folhas (Figura 13). A redução da concentração de N-aminossolúveis nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  foi, provavelmente, devida à menor absorção de  $\text{NH}_4^+$  a partir das raízes dessas plantas (Figura 10). Estes resultados concordam com os encontrados por Magalhães, Huber e Tsai (1995), trabalhando com três diferentes genótipos de milho. Em várias outras culturas, tais como ervilha, *Leptochloa fusca* e *Populus tremula*, também foram encontradas maiores concentrações de N-aminossolúveis nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  quando comparadas com as cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  (FRECHILLA *et al.*, 2001; MAHMOOD; KAISER, 2003; EHLTING *et al.*, 2007). Neste trabalho, também foi encontrado que plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  acumularam mais carboidratos solúveis nas raízes que as nutridas com outras fontes de N, especialmente aos 4 e 18 dias de início do tratamento

salino (Figura 11C). Segundo Mahmood e Kaiser (2003), o crescimento de raízes na presença de  $\text{NH}_4^+$  foi prejudicado pelo maior acúmulo de carboidratos e compostos nitrogenados nas raízes.

O acúmulo de aminoácidos livres em tecidos de plantas sob salinidade é comumente reportado como uma resposta ao estresse salino, sendo isto observado tanto para genótipos sensíveis como tolerantes aos sais (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004). O papel da maioria desses N-aminossolúveis que são acumulados ainda não está bem esclarecido. É provável que esses compostos presentes em altas concentrações contribuam para processos de regulação osmótica e de osmoproteção. Além de aumentar a pressão osmótica do citosol, baixando seu potencial hídrico, eles podem proteger macromoléculas, ou servir como fonte de N e energia, podendo também atenuar os efeitos do estresse oxidativo por eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) (MANSOUR, 2000). É importante também ressaltar que o aumento do “pool” de aminoácidos livres em condições de estresse salino parece ser um mecanismo de prevenção à acumulação de amônia livre em níveis tóxicos na planta (GIVAN, 1979).

#### **4.6. Nitrogênio total**

Os teores de nitrogênio total (N-total) foram afetados pela salinidade, exceto nos colmos, e pelas diversas fontes de N em todos os órgãos estudados das plantas de milho, porém não foram afetados pelo tempo de exposição ao estresse salino, exceto nas folhas (Tabela 9). De modo geral, a salinidade reduziu os teores de N-total nas diversas partes das plantas de milho (Figura 14). Nas folhas, aos 4 dias do início do tratamento salino, as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  tiveram os teores de N-total reduzidos pela salinidade, sendo essas reduções de 13% e 30%, respectivamente, em comparação com os controles (Figura 14A). Aos 11 dias, apenas as plantas tratadas com ambas as fontes de N ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ) tiveram os teores de N-total afetados pela salinidade. Contudo, no final do experimento, o N-total das plantas nutridas com apenas uma fonte de N,  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , foi

**Tabela 9** – Resumo da análise de variância dos teores de N-total de plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (ns) = não significativo

Fonte de variação	Valores de <i>F</i>		
	N-total		
	Folha	Colmo	Raiz
NaCl (S)	26,0**	0,2 <sup>ns</sup>	13,1**
Fonte de N (N)	14,8**	19,5**	16,6**
Tempo (T)	9,7**	0,2 <sup>ns</sup>	1,9 <sup>ns</sup>
S x N	5,2**	4,5*	2,2 <sup>ns</sup>
S x T	4,0*	1,9 <sup>ns</sup>	3,2 <sup>ns</sup>
N x T	11,7**	1,3 <sup>ns</sup>	3,8**
S x N x T	4,7**	0,5 <sup>ns</sup>	3,1*

reduzido pela salinidade, sendo observadas maiores reduções nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  (17%, em comparação com o controle). Com relação aos colmos (Figura 14B), os teores de N foram reduzidos pela salinidade apenas nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  ou com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Nesses órgãos, a maior concentração de N-total, aos 11 e 18 dias, em condições salinas, foi verificada nas plantas submetidas à mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e ao  $\text{NH}_4^+$  quando comparadas com aquelas cultivadas com somente  $\text{NO}_3^-$  (Figura 14B). Nas raízes das plantas da primeira coleta, a adição de NaCl no meio de cultivo, reduziu os teores de N-total em todos os regimes de N empregados, sendo observada a mais elevada redução nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  (15%, em relação ao controle). Aos 11 dias do início do tratamento salino, apenas as plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$  sofreram redução no conteúdo de N-total (12%, em comparação com o controle). No final do experimento, quando as plantas estavam expostas por 18 dias à salinidade, os teores de N-total foram reduzidos pelo estresse salino nas raízes das plantas nutridas com apenas uma fonte de N ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) (Figura 14C).

De maneira geral, os teores de N-total e mais nitidamente os de N-aminossolúveis, se mostraram maiores, tanto em condições controle como de estresse, nas diversas partes das plantas de milho nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e com apenas  $\text{NH}_4^+$ . Contudo, nos resultados de proteínas solúveis não foi observada uma correlação coerente entre as diversas fontes de N e os conteúdos de proteínas nas folhas e colmos. Em plantas de trigo, uma maior



concentração de N foi encontrada nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  comparadas com as nutridas com  $\text{NO}_3^-$  (LIPS *et al.*, 1990). Os menores níveis de N em plantas submetidas à salinidade podem afetar os mecanismos de síntese de proteína, de modo, a contribuir para a redução do crescimento e desenvolvimento (PARIDA; DAS, 2004).

De maneira geral, os teores de N-total e mais nitidamente os de N-aminossolúveis, se mostraram maiores, tanto em condições controle como de estresse, nas diversas partes das plantas de milho nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e com apenas  $\text{NH}_4^+$ . Contudo, nos resultados de proteínas solúveis não foi observada uma correlação coerente entre as diversas fontes de N e os conteúdos de proteínas nas folhas e colmos. Em plantas de trigo, uma maior concentração de N foi encontrada nas plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  comparadas com as nutridas com  $\text{NO}_3^-$  (LIPS *et al.*, 1990). Os menores níveis de N em plantas submetidas à salinidade podem afetar os mecanismos de síntese de proteína, de modo, a contribuir para a redução do crescimento e desenvolvimento (PARIDA; DAS, 2004).

#### **4.7. Enzimas do metabolismo do N**

A salinidade influencia os diversos passos do metabolismo do N, tais como a absorção, distribuição e assimilação deste nutriente. Neste trabalho, verificou-se que o estresse salino imposto influenciou de maneira significativa as atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do N, exceto a da redutase do nitrito (NiR) (Tabela 10). Além disso, a fonte de N empregada ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) e a união destes dois fatores também influenciaram a atividade das enzimas do metabolismo do N das plantas de milho com exceção da redutase do nitrato (NR), NiR e sintase do glutamato (GOGAT) nas folhas (Tabela 10). A figura 15 apresenta o efeito do estresse salino e das diferentes fontes de N na atividade da NR de folhas e raízes de plantas de milho, em função do tempo de exposição à salinidade. Nas folhas, maiores atividades da NR foram encontradas aos 4 e 11 dias do início do tratamento salino (Figura 15A). Com 4 dias, o estresse salino não alterou a atividade da

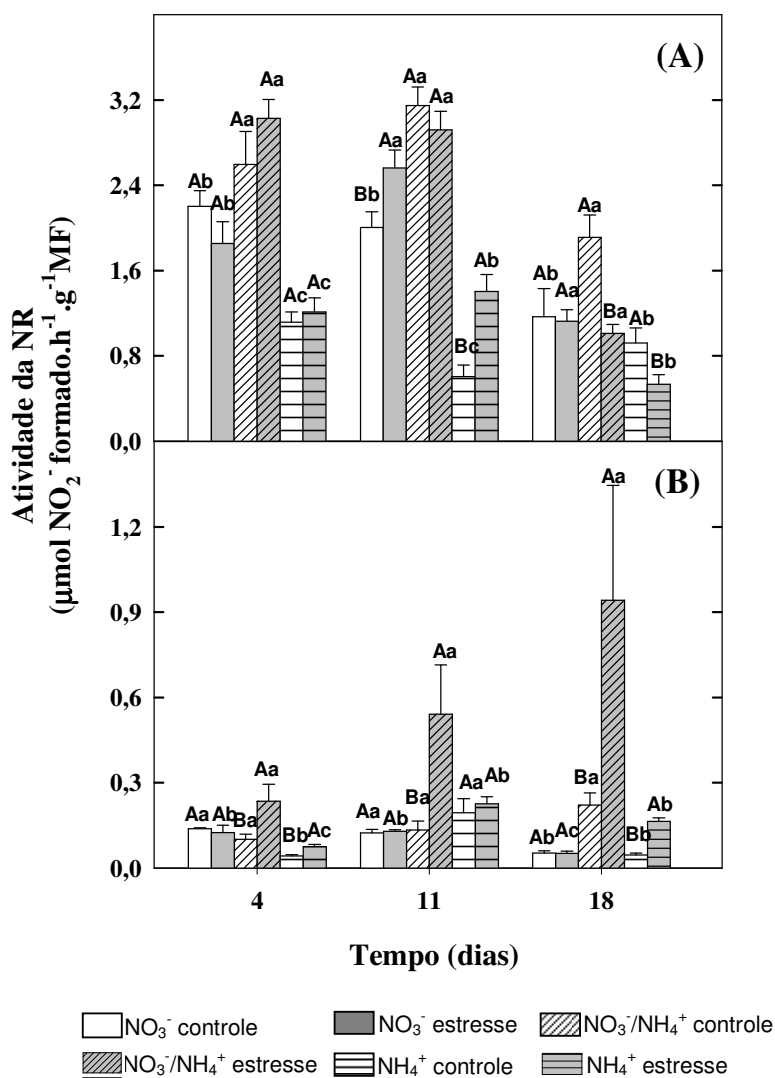


**Tabela 10** – Resumo da análise de variância da atividade da redutase do nitrato (NR), da redutase do nitrito (NiR), da sintetase da glutamina (GS) e da sintase do glutamato (GOGAT) em plantas de milho submetidas a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. Os dados foram coletados em três tempos diferentes (4, 11 e 18 dias do início da imposição do estresse salino). Diferenças significativas são representadas por (\*\*) e (\*) para  $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,05$ , respectivamente. (<sup>ns</sup>) = não significativo

Fonte de variação	Valores de <i>F</i>							
	NR		NiR		GS		GOGAT	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
NaCl (S)	11,1**	17,3**	1,8 <sup>ns</sup>	0,8 <sup>ns</sup>	5,8*	41,8**	36,2**	12,1**
Fonte de N (N)	100,2**	5,3**	339,0**	163,1**	19,8**	79,6**	22,4**	13,6**
Tempo (T)	21,6**	3,6 <sup>ns</sup>	85,8**	80,1**	8,9**	49,8**	18,5**	76,0**
S x N	0,4 <sup>ns</sup>	7,1**	0,5 <sup>ns</sup>	7,0**	6,6**	16,6**	1,1 <sup>ns</sup>	25,9**
S x T	1,8 <sup>ns</sup>	9,7**	5,9**	16,1**	6,6**	3,5**	5,3**	2,9 <sup>ns</sup>
N x T	6,0**	21,4**	24,2**	14,1**	5,3**	8,7**	21,2**	13,1**
S x N x T	4,7**	3,9**	5,7**	3,0*	12,1**	4,8**	1,8 <sup>ns</sup>	22,2**

NR, porém com 11 dias a salinidade aumentou esta atividade em 28% e 131% nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e com  $\text{NH}_4^+$ , respectivamente, em comparação aos controles. Contudo, no final do experimento, foram observadas reduções na atividade da NR nas plantas cultivadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e naquelas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  e submetidas à salinidade (Figura 15A). Com relação às raízes, nas plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  foram observados grandes aumentos na atividade da NR em meio salino, durante todo o período experimental (Figura 15B). A atividade dessa enzima foi maior nas folhas do que nas raízes. Em discordância a esses resultados, plantas de arroz e soja apresentaram maiores atividades dessa enzima nas raízes (KATIYAR; DUBEY, 1992; BOURGEGAS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992).

O estresse salino pode provocar redução (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2001; NATHAWAT *et al.*, 2005; DEBOUBA *et al.*, 2006b), aumento (KATIYAR; DUBEY, 1992; BOURGEGAS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992) ou não alterar (ASLAM; HUFFAKER; RAINS, 1984) a atividade da NR. Em plantas de arroz, a atividade da NR, *in vivo*, foi aumentada pela salinidade marcadamente nas plantas tolerantes aos sais, enquanto que nas sensíveis foi observada uma redução nessa atividade. Esses autores concluíram que a tolerância à salinidade pode estar associada com a maior atividade da NR, *in*



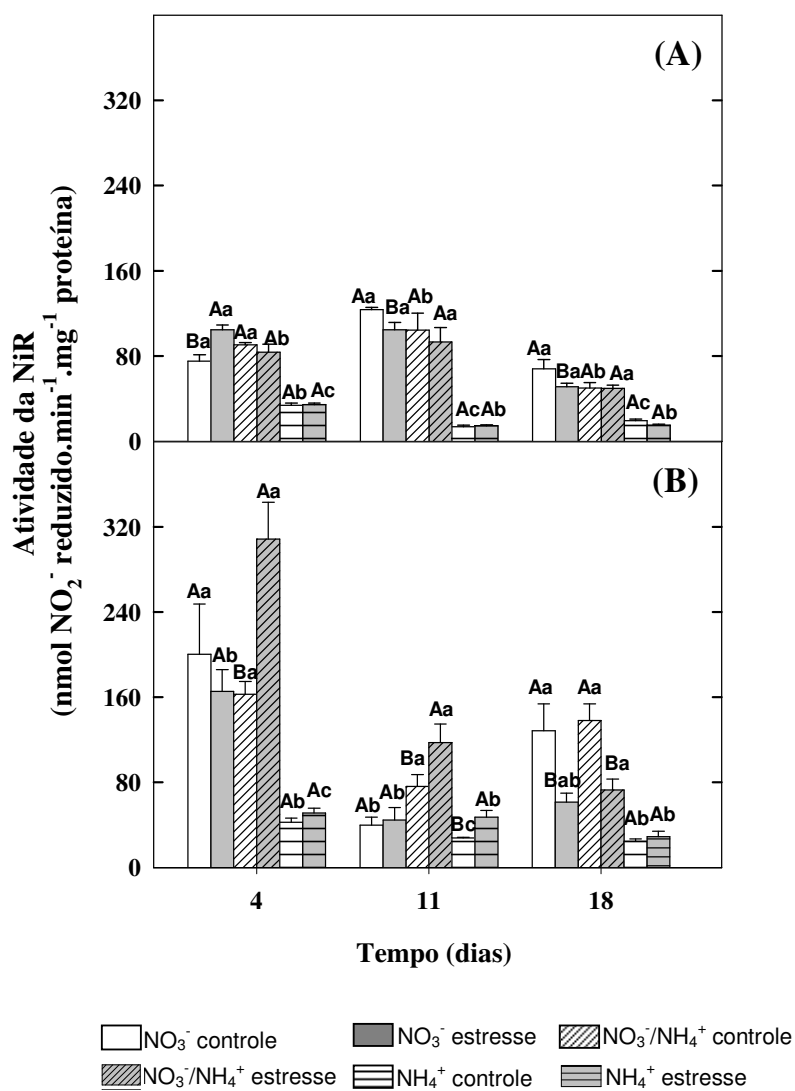
**Figura 15.** Atividade da redutase do nitrato (NR) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúsculas nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

*vivo*, e sua maior ativação sob salinização (KATIYAR; DUBEY, 1992). A redução na atividade da NR, encontrada em várias culturas submetidas à salinidade, é atribuída à inibição da absorção de  $\text{NO}_3^-$  pelo  $\text{Cl}^-$ , reduzindo a quantidade de substrato no sítio ativo da enzima (SILVEIRA *et al.*, 2001; NATHAWAT *et al.*, 2005). A redução na atividade da NR em plantas salinizadas de *Bruguiera paviflora* foi acompanhada por um decréscimo nos teores de nitrato e de N-total (PARIDA; DAS, 2004). De maneira similar, nitrato foi o principal regulador da expressão e da atividade da NR em plantas de milho (ABD-EL BAKI *et al.*, 2000).

Nas folhas, as maiores atividades, tanto em condições controle, como de salinidade, foram encontradas nas plantas tratadas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 15A), sendo isto devido à maior concentração de  $\text{NO}_3^-$  observada nos tecidos foliares destas plantas (Figura 8A). Estes resultados corroboram os encontrados por Bourgeais-Chaillou, Perez-Alfocea e Guerrier (1992), trabalhando com plantas de soja.

A atividade da NiR foi pouco afetada pela salinidade nas folhas das plantas de milho, independente da fonte de N empregada (Figura 16A). A menor sensibilidade da NiR aos sais, comparada com a da NR, garante a manutenção de baixas concentrações de  $\text{NO}_2^-$ , o qual é um íon bastante tóxico para o meio celular (DEBOUBA *et al.*, 2006b).

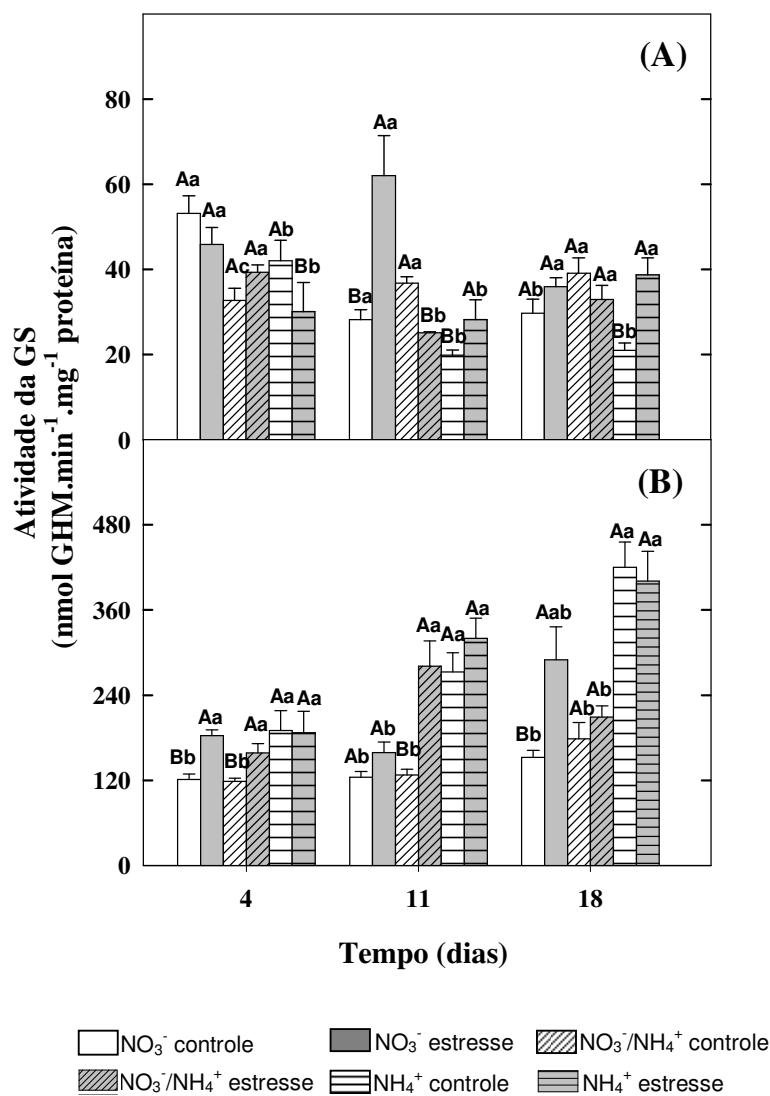
Nas raízes, no entanto, foram constatados maiores efeitos da salinidade na atividade da NiR (Figura 16B). Aos 4 e 11 dias do início do tratamento salino, foram observados aumentos de 90% e 53%, respectivamente, nas plantas nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , em comparação com os controles. Ao final do experimento, a atividade da NiR foi reduzida pela salinidade nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (Figura 16B). De modo geral, as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  apresentaram maiores atividades da NiR, tanto em condições controle como de estresse salino. Isto pode ser



**Figura 16.** Atividade da redutase do nitrito (NiR) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúsculas nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

relacionado às maiores atividade da NR verificadas nessas plantas, já que ela produz o substrato para a atividade da NiR. Em plantas de mostarda, tanto a atividade da NR como a da NiR foram maiores em plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  do que naquelas nutridas com  $\text{NH}_4^+$ , tanto em condições controle, como de salinidade (NATHAWAT *et al.*, 2005). Em plantas de arroz, a salinidade aumentou a atividade da NiR (KATIYAR; DUBEY, 1992), enquanto que em plantas de soja e tomate a atividade desta enzima foi reduzida pelo estresse salino (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992; DEBOUBA *et al.*, 2007).

O amônio produzido pela ação combinada das enzimas NR/NiR ou a partir de outras origens (solução do solo, fotorrespiração, degradação de proteínas) é incorporado em aminoácidos pela ação do sistema GS/GOGAT (sintetase da glutamina e sintase do glutamato). A figura 17 mostra a atividade da GS em folhas e raízes de plantas de milho submetidas a diferentes fontes de N e sob condições de salinidade. Nas folhas, a atividade da GS sofreu reduções e aumentos com a salinidade dependendo da fonte de N a que a planta foi submetida e do tempo de exposições ao estresse (Figura 17A). Com relação às raízes, as plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , aos 4 e aos 18 dias de estresse, e com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , aos 4 e 11 dias de estresse, tiveram a atividade da GS aumentada pela salinidade, enquanto as plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  não tiveram a atividade dessa enzima afetada pelo estresse salino (Figura 17B). Além disso, essas últimas plantas apresentaram em suas raízes maior atividade da GS em condições controle, durante todo o período experimental, e em ambas condições controle e de salinidade, aos 18 dias, em comparação com os demais tratamentos de N (Figura 17B). O maior acúmulo de N-aminossolúveis observado nas raízes destas plantas pode ser devido a uma maior atividade da GS (Figura 13C e 17B). Além disso, o maior conteúdo de proteínas solúveis nas raízes das plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$ , comparado com as dos demais tratamentos de N, aos 18 dias, também puderam ser relacionados com a maior atividade da

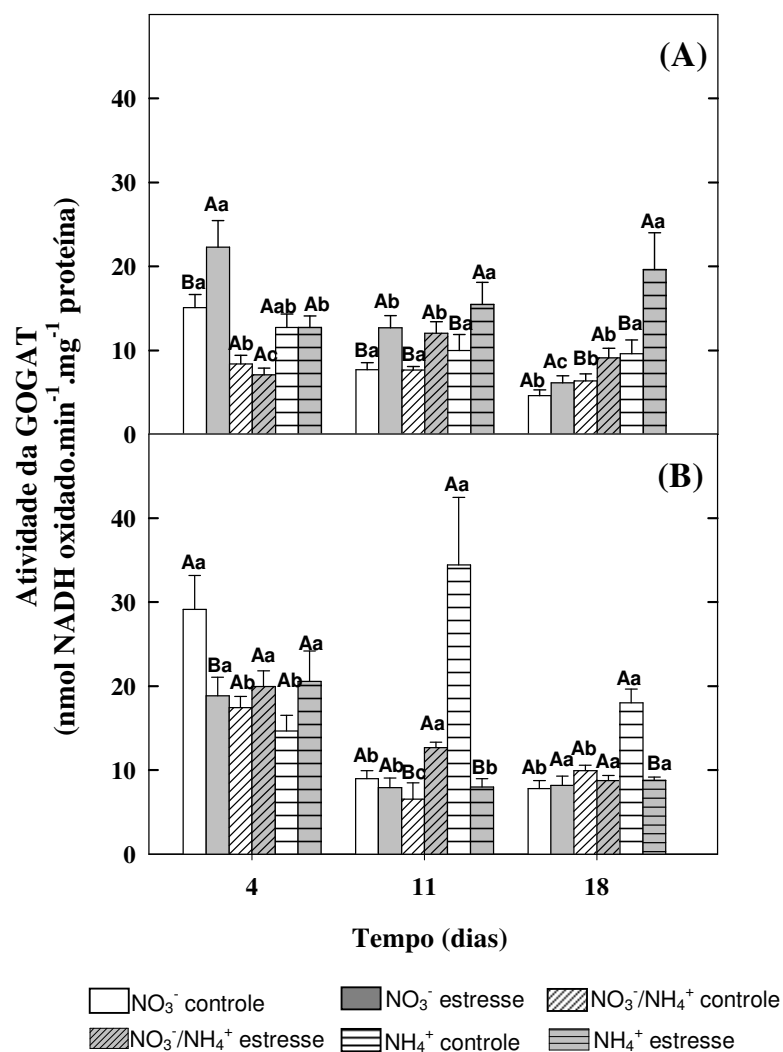


**Figura 17.** Atividade da sintetase da glutamina (GS) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúsculas nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .

GS (Figura 12C e 17B). De maneira similar, Magalhães e Huber (1991), trabalhando com plantas de arroz, verificaram que a atividade da GS aumentava nitidamente na presença de  $\text{NH}_4^+$ , porém este aumento foi acompanhado pela redução de  $\text{NH}_4^+$  livre nos tecidos, fato que não foi observado no presente trabalho (Figura 10C). Esses autores sugeriram que a GS pode ser um fator chave para a desintoxicação do  $\text{NH}_4^+$  em folhas de arroz. A maior atividade da GS e a maior concentração de carboidratos solúveis nas raízes de plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  (Figura 11C) podem favorecer o crescimento dessas plantas. De acordo com Schortemeyer, Stamp e Feil (1997), um suprimento eficiente de esqueletos carbônicos em raízes de milho, para a assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , é requerido para o máximo crescimento das plantas quando em altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ .

A atividade da GS também foi aumentada em outras espécies de plantas em resposta às condições salinas, como por exemplo, em cevada (KANT *et al.*, 2007), em soja (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992) e em tomate (CRAMER; GAO e LIPS, 1999; DEBOUBA *et al.*, 2006a, 2007). Em plantas de arroz, a superexpressão da GS cloroplástica aumentou a tolerância das plantas aos sais, devido ao aumento da capacidade de reassimilação do íon  $\text{NH}_4^+$  gerado no processo de fotorrespiração (HOSHIDA *et al.*, 2000). O aumento de atividade da GS, em condições salinas, nas raízes das plantas de milho submetidas à nutrição com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (Figura 17B) pode estar associada com uma maior produção de glutamina e, posteriormente, com outros solutos orgânicos envolvidos com o ajustamento osmótico sob condições de estresse salino (LORENZO; SIVERIO; CABALLERO, 2001; KANT *et al.*, 2007).

De modo geral, nas folhas, a atividade da GOGAT aumentou ou permaneceu inalterada pela salinidade nos diversos tratamentos de N (Figura 18A). Aos 18 dias do início do tratamento salino, observou-se que a atividade dessa enzima foi maior nas folhas das plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  seguida das nutridas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , tanto em



**Figura 18.** Atividade da sintase do glutamato (GOGAT) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho submetidas à salinidade a diferentes regimes de N em função do tempo de exposição à salinidade. As barras representam o erro padrão. Colunas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro de cada tratamento de N e colunas com mesmas letras minúsculas nos diversos tratamentos de N entre os controles ou entre os tratamentos salinos não são significativamente diferentes,  $p \leq 0,05$ .



condições controle como de estresse salino. A maior atividade da GOGAT em plantas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  também foi observada em outras culturas, como mostarda (NATHAWAT *et al.*, 2005) e soja (BOURGEAIS-CHAILLOU; PEREZ-ALFOCEA; GUERRIER, 1992). Contudo, em cevada, a fonte de N não mostrou nenhum efeito significativo na atividade da GOGAT (KANT *et al.*, 2007). Com relação às raízes, a atividade da GOGAT foi reduzida pela salinidade, nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , aos 4 dias de estresse salino, e nas nutridas com  $\text{NH}_4^+$  a partir do 11º dia (Figura 18B). Além disso, essas plantas apresentaram maiores atividades em condições controle, em seus respectivos tempos de coleta, em comparação com as dos demais tratamentos de N. De forma semelhante ao encontrado neste trabalho, raízes de tomate também apresentaram redução da atividade da GOGAT em condições de salinidade, porém, em raízes de cevada, esta atividade foi aumentada por esse estresse (CRAMER; GAO; LIPS, 1999; KANT *et al.*, 2007).

Embora o sistema GS/GOGAT trabalhe de forma coordenada, no presente estudo não se observou uma relação entre as respostas da atividade dessas enzimas à salinidade. Berteli *et al.* (1995) encontrou um decréscimo da GS e um aumento da GOGAT em folhas destacadas de tomate em resposta à salinidade, contudo Cramer, Gao e Lips (1999) observaram o contrário em raízes de tomate sob estresse salino.

## 5. CONCLUSÕES

1. A nutrição das plantas com a mistura  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  provocou uma melhora do crescimento das plantas sob condições controle, especialmente na parte aérea, porém não foi capaz de minimizar os efeitos deletérios da salinidade;
2. Com relação às trocas gasosas, as plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  foram mais sensíveis à salinidade quando submetidas ao estresse salino por longo período;
3. O tratamento com  $\text{NO}_3^-$  foi o melhor em termos de relações iônicas comparado aos demais tratamentos de N, apresentando menor relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ , particularmente nas plantas submetidas à salinidade por 18 dias;
4. As respostas à salinidade em termos de acúmulo de solutos orgânicos variaram com a fonte de N e o tempo de exposição à salinidade;
5. A presença de íons  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva influenciou positivamente a atividade da NR e da NiR em folhas de plantas milho;
6. A maior atividade da GS nas raízes de plantas tratadas com  $\text{NH}_4^+$  comparadas com as dos demais tratamentos foi relacionada ao maior acúmulo de N-aminossolúveis e de proteínas solúveis nessas plantas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL BAKI, G.K.; SIEFRITZ, F.; MAN, H.M.; WEINER, H.; KALDENHOFF, R.; KAISER, W.M. Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 515-521, 2000.

ALMEIDA, T.C. Utilização do milho e do sorgo no Brasil. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 11-21.

AL-MUTAWA, M.M.; EL-KATONY, T.M. Salt tolerance of two wheat genotypes in response to the form of nitrogen. **Agronomie**, v. 21, p. 259-266, 2001.

ALVAREZ PIZARRO, J.C. **Caracteres fisiológicos e bioquímicos da tolerância à salinidade em clones de cajueiro anão-precoce**. 2006. 135 f. (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ARMSTRONG W. Waterlogged soils. In: ETHERINGTON, J.R. (Ed.) **Environment and plant ecology**, Chichester: John Wiley & Sons, 1982. p. 290-330.

ASHRAF, M. Breeding for salinity tolerance in plants. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 17-42, 1994.

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

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

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

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

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

BENDIXEN, R.; GERENDÁS, J.; SCHINNER, K; SATTELMACHER, B.; HANSEN, U.P. Difference in zeaxanthin formation in nitrate- and ammonium-grown *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 255-261, 2001.

BERTELI, F.; CORRALES, E.; GUERRERO, C.; ARIZA, M.J.; PLIEGO, F.; VALPUESTA, V. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 259-264, 1995.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1099-1111, 1995.

BOTELLA, M.A.; CERDA, A.; LIPS, S.H. Kinetics of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  uptake by wheat seedlings: Effect of salinity and nitrogen source. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 53-57, 1994.

BOTELLA, M.A.; MARTINEZ, V.; NIEVES, M.; CERDÁ, A. Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. **Journal Plant Nutrition**, v. 20, p. 793-804, 1997.

BOURGEAIS-CHAILLOU, P.; PEREZ-ALFOCEA, F., GUERRIER, G. Comparatives effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1225-1233, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.

BRITO, D.T.; KRONZUCKER, H.J.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: A critical review. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 567-584, 2002.

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

BRUGNOLI, E.; LAUTERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C<sub>3</sub> non-halophytes. **Plant Physiology**, v. 95, p. 628-635, 1991.

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

CARILLO, P.; MASTRLONARDO, G.; NACCA, F.; PARISI, D.; VERLOTA, A.; FUGGI, A. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. **Functional Plant Biology**, v. 35, p. 412-426, 2008.

CARVAJAL, M.; MATINEZ, V.; ALCARAZ, F.C. Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 95-101, 1999.

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

CEREZO, M.; FLORS, V.; LEGAZ, F.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Characterization of the low affinity transport system for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by *Citrus* roots. **Plant Science**, v. 160, p. 95-104, 2000.

CEREZO, M.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; PRIMO-MILLO, E. Influence of chloride and transpiration on net <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake rate by *Citrus* roots. **Annals of Botany**, v. 84, p. 117-120, 1999.

CHAILLOU, S.; LAMAZE, T. Ammonical nutrition of plants. In: MOROT-GAUDRY, J-F. (Ed.). **Nitrogen assimilation by plants**. New Hampshire: Science Publishers Inc., 2001. p. 53-69.

CLAUSSEN, W.; LENZ, F. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. **Plant and Soil**, v. 95, p. 95-102, 1999.

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

CRAMER, M.D.; GAO, Z.F.; LIPS, S. H. The influence of dissolved inorganic carbon in the rhizosphere on carbon and nitrogen metabolism in salinity-treated tomato plants. **New Phytologist**, v. 142, p. 441-450, 1999.

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

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

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

DAVENPORT, R.J.; TESTER, M. A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. **Plant Physiology**.v. 122, p. 823-834, 2000.

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

DEANE-DRUMOND, C.E. A comparison of regulatory effects of chloride on nitrate uptake, and of nitrate on chloride uptake into *Pisum sativum* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 66, p. 115-126, 1986.

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

DEBOUBA, M.; GOUIA, H.; VALADIER, M.-H, GHORBEL, M.H.; SUZUKI, A. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 409-419, 2006b.

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

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

DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plant under stressful conditions. In: DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of Plant and Crop Physiology**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 605-625.

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

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

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

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

FEIJÃO, A.R. **Efeitos do nitrato no crescimento, no acúmulo de íons e nas trocas gasosas de plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas à salinidade**. 2007. 69 f. (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

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

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

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

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

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

GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J.; DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C. **Aspectos econômicos da produção e utilização do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006, 12 p. (Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, Circular Técnica, nº 74).

GARG, B.K.; KATHJU, S.; VYAS, S.P.; LAHIRI, A.N. Effect of saline water irrigation on tolerant and sensitive wheat arieties under disparate soil fertility condition. **Annals of Arid Zone**, v. 29, p. 179-189, 1990.

GARG, B.K.; VYAS, S.P.; KATHJU, S.; LAHIRI, A.N.; MALI, P.C.; SHARMA, P.C. Salinity-fertility interaction on growth, mineral composition and nitrogen metabolism of Indian mustard. **Journal of Plant Nutrition**, v. 16, p. 1637-1650, 1993.

GIVAN, V.C. Metabolic detoxication of ammonia in tissues of higher plants. **Phytochemistry**, v. 18, p. 375-382, 1979.

GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. Nitrate inhibition of chloride influx in barley: Implications for proposed chloride homeostase. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, p. 556-566, 1985.

GOUIA, H.; GHORBAL, M.H.; TOURINE, B. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on  $\text{NO}_3^-$  reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1409-1418, 1994.

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

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

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



GUIMARÃES, F.V.A. **Respostas fisiológicas e bioquímicas em plantas de feijão-de-corda cv. Pitiúba submetidas ao estresse com NaCl em diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> e CaSO<sub>4</sub>**. 2005. 176 f. (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.

GUO, S.; CHEN, G.; ZHOU, Y.; SHEN, Q. Ammonium nutrition increases photosynthesis rate under water stress at early development stage of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 296, p. 115-124, 2007.

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

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

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

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

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

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

IVANKO, S.; INGUERSEN, J. Investigation on the assimilation of nitrogen by maize roots and the transport of some major nitrogen compounds by xylem sap. **Physiologia Plantarum**, v. 24, p. 355-362, 1971.

KAISER, W. M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation *in vivo* by CO<sub>2</sub> availability. **Plant Physiology**, v. 96, p. 363–367, 1991.

KAISER, W.M.; FÖRSTER, J. Low CO<sub>2</sub> prevents nitrate reduction in leaves. **Plant Physiology**, v. 91, p. 970–974, 1989

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

KANT, S.; KAFKAFI, U. Ammonium and nitrate as a nitrogen source for plants. **Advanced Plant Physiology**, v. 5, p. 463–78, 2003.

KANT, S.; KANT, P.; LIPS, H.; BARAK, S. Partial substitution of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 303-311, 2007.

KATERJI, N.; van HOORN, J.W.; HAMDY, A.; KARAM, F.; MASTRORILLI, M. Effect of salinity on water stress, growth, and yield of maize and sunflower. **Agricultural Water Management**, v. 30, p. 237-249, 1996

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

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, p. 482-487, 2000.

KHAMIS, S; LAMAZE, T.; LEMOINE, Y.; FOYER, C. Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation: relationships between electron transport and carbon assimilation. **Plant Physiology**, v. 94, p. 1436-1443, 1990.

KRONZUCKER, H.J; BRITTO, D.T.; DAVENPORT, R.J.; TESTER, M. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 335-337, 2001.

KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Compartmentation and flux characteristics of ammonium in spruce. **Planta**, v.196, p.691-698, 1995.

KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Kinetics of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> influx in spruce. **Plant Physiology**, v. 110, p. 773–79, 1996.

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

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

LEWIS, O.A.M.; CHADWICK, S. An  $^{15}\text{N}$  investigation into nitrogen assimilation in hydroponically-grown barley (*Hordeum vulgare* L.cv. Clipper) in response to nitrate, ammonium and mixed nitrate and ammonium nutrition. **New Phytologist**, v. 95, p. 635-646, 1983.

LEWIS, O. A. M.; JAMES, D. M.; HEWITT, E. J. Nitrogen assimilation in barley *Hordeum vulgare* L. cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. **Annals of Botany**, v. 49, p. 39-49, 1982.

LEWIS, O.A.M.; LEIDI, E.O.; LIPS, S.H. Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. **New Phytologist**, v. 111, p. 155-160, 1989.

LIN, H.; SANDRA, S.S.; SCHUMAKER, K.S. Salt sensitivity and the activities of the H-ATPase in cotton seedlings. **Crop Science**, v. 37, p. 190-197, 1997.

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

LIRA, M.A.; FARIS, M.A.; MAFRA, R.C. Soil fertility and fertilizer use research in intercropping systems in Northeast Brazil. **Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin**, v. 5, p. 151-156, 1982.

LIU, J.; ZHU, J. An arabidopsis mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 94, p. 14960-14964, 1997.

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

MACHADO, F.O.; MAGALHÃES, P.C.; MARRIEL; GAMA, E.E.G.; OLIVEIRA, A.C.; CANTÃO, F.R. **Caracterização de genótipos para uso e eficiência de nitrogênio em milho e influência da adubação nitrogenada sobre a incidência e severidade da mancha foliar**

de *Phaeosphaeria maydis*. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2004, 8 p. (Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, Circular Técnica, nº 53).

MAGALHÃES, P.C.; DURAES, F.O.M.; CARNEIRA, N.R.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002, 23 p. (Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, Circular Técnica, nº 22).

MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. **Fertilizer Research**, v. 21, p. 1-6, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

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

MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, v. 15, p. 873–885, 1976

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

MISRA, N.; GUPTA, A.K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 11-18, 2006.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.

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

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

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

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

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

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

PAES, M.C.D. **Aspectos químicos, físicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2006, 6 p. (Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, Circular Técnica, nº 75).

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

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

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

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

PINAZZA, L.A. Perpectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 1-10.

PRATA, F.C. **Principais culturas do Nordeste**. v. 1. Fortaleza: Imprensa Universitária do Ceará, 1969. 191 p.

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

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

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

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

SAGI, M.; DOVRAT, A.; KIPNIS, T; LIPS, H. Ionic balance, biomass production, and organic nitrogen as affected by salinity and nitrogen source in annual ryegrass. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, p. 1291-1316, 1997.

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

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

SCHORTEMMEYER, M; STAMP, P.; FEIL, B. Ammonium tolerance and carbohydrate status in maize cultivars. **Annals of Botany**, v. 79, p. 25-30, 1997.

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

SEEMANN, J.R.; CRITCHLEY, C. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. **Planta**, v.164, p.151-162, 1985.

SHABALA, S. Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 825-837, 2000.

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

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

SIDDIQI, M.Y.; MALHOTRA, B.; MIN, X; GLASS, A.D.M. Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 165, p.191-197, 2002.

SILBERBUSH, M.; LIPS, S.H. Nitrogen concentration, ammonium nitrate ratio and NaCl interaction in vegetative and reproductive growth of peanuts. **Physiologia Plantarum**, v. 74, p. 493-498, 1988.

SILVA, J.V. **Respostas fisiológicas de dois genótipos de sorgo-forrageiro submetidos à salinidade**. 2003. 145 f. (Doutorado em Agronomia – Fitotecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

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

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

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

SPEER, M.; BRUNC, A.; KAISER, W.M. Replacement of nitrate by ammonium as the nitrogen source increases the salt sensitivity of pea plants I Ion concentrations in roots and leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, p. 1215-1221, 1994.

SPEER, M.; KAISER, W.M. Replacement of nitrate by ammonium as the nitrogen source increases the salt sensitivity of pea plants. II. Inter- and intracellular solute compartmentation in leaflets. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, p. 1223-1231, 1994.

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

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

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



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

WANG, M.Y.; GLASS, A.D.M.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. **Plant Physiology**, v. 104, p. 899-906, 1994.

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

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

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

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

YAMAMOTO, A.; SHIM, I.S.; FUJIHARA, S.; YONEYAMA, T.; USUI, K. Effect of difference in nitrogen media on salt-stress response and contents of nitrogen compounds in rice seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 50, p. 85-93, 2004.

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

YOKOI, S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Salt stress tolerance of plants. **JIRCAS Working Report**, p. 25-33, 2002.

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

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

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