

Mecanismos cinéticos de inibição da absorção de nitrato em raízes de feijão caupi expostas à salinidade

RAFAEL MAGALHÃES DE ARAGÃO

RESUMO

A absorção líquida de nitrato é um processo dependente da relação influxo/efluxo na membrana plasmática das raízes. O balanço entre esses dois processos pode afetar a aquisição de nitrato em plantas expostas ao estresse salino. Infelizmente, ainda não se conhece os mecanismos de inibição da absorção de nitrato na presença de excesso de íons Na^+ e Cl^- , situação comum nos solos salinos sódicos. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da salinidade sobre os mecanismos de influxo e efluxo de NO_3^- em raízes de feijão caupi, caracterizando-se a cinética da absorção na presença de agentes iônicos e osmóticos. Raízes de feijão caupi foram destacadas e incubadas para as mensurações de influxo e efluxo de NO_3^- em experimentos de tempo e níveis de nitrato variados. O pré-tratamento das plantas com 50 e 100 mM de NaCl alterou a cinética de influxo e efluxo de nitrato, comparando-se com raízes de plantas não pré-tratadas: induzindo efeitos mais pronunciados sobre ambos processos, inibindo o influxo e estimulando o efluxo. O efeito inibitório do NaCl sobre o influxo de nitrato foi dependente da dose do sal. O NaCl 100 mM reduziu o valor de V_{\max} de 12,35 (controle) para 7,14 e manteve o valor de K_m praticamente inalterado (3,05 e 3,21, respectivamente), evidenciando uma inibição do tipo não competitiva. Interessantemente, o Na_2SO_4 100 mM causou o mesmo tipo de inibição do NaCl mas o KCl 100 mM causou uma inibição incompetitiva, reduzindo simultaneamente V_{\max} e K_m . No sentido de verificar os efeitos da componente osmótica da salinidade, observou-se que PEG e Manitol causaram inibição do tipo aproximadamente competitiva, aumentando o K_m (de 3,01 do controle para 6,21 e 7,35 para PEG e Manitol, respectivamente), e mantendo V_{\max} ligeiramente abaixo do controle. O efeito inibitório do NaCl foi mais intenso sobre o sistema de baixa afinidade de absorção de nitrato (60%) do que sobre o de alta afinidade (45%). Os efeitos do NaCl e Manitol sobre o sistema de alta afinidade, ambos em 100 mM, foram semelhantes entre si no tocante ao tipo de inibição: ambos reduziram V_{\max} e aumentaram os valores de K_m . Quando concentrações isosmóticas de NaCl, PEG e manitol ($\Psi_{os} = -0,23$ MPa) foram testadas, verificou-se que os dois primeiros induziram aumentos no efluxo (15 e 34%, respectivamente), enquanto que, inesperadamente, o manitol causou uma redução de 40%, todos comparados ao controle. Concluindo, a salinidade causa redução na absorção líquida de NO_3^- em raízes de feijão caupi através de redução no influxo e aumento no efluxo. No influxo, ocorre uma inibição não-competitiva com o Cl^- , tanto no sistema de baixa como no de alta afinidade. Aparentemente, o componente osmótico é mais importante na inibição da absorção de nitrato, mas aparentemente o tipo de sal (íons) também interfere no processo. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer completamente os mecanismos envolvidos na inibição.

ABSTRACT

Nitrate uptake is a process dependent on the influx/ efflux relationship in the plasma membrane of roots cells. The balance between these two processes may affect the NO_3^- acquisition in plants exposed to salt stress. Unfortunately, we do not know the mechanisms of inhibition of NO_3^- uptake in the presence of excess Na^+ and Cl^- ions, a common situation in saline-sodium soil. The objective was to evaluate the effect of salinity on the NO_3^- influx and efflux mechanisms in cowpea roots, building the uptake kinetics in the presence of ion and osmotic agents. Cowpea roots were excised for nitrate influx and efflux measurements in time-course and NO_3^- levels experiments. In plants pre-treated with 50 and 100 mM NaCl, NO_3^- influx and efflux kinetics has been altered, compared with plants not pre-treated roots: inducing pronounced effects on both processes, inhibiting the influx and stimulating the efflux. The NaCl inhibitory effect on the NO_3^- influx was dependent on the dose of salt. The 100 mM NaCl reduced the value of V_{\max} (control) of 12.35 to 7.14 and the K_m value remained unchanged (3.05 and 3.21, respectively), showing a non-competitive inhibition. Interestingly, the Na_2SO_4 100 mM caused the same inhibition of NaCl, but 100 mM KCl caused an uncompetitive inhibition, reducing V_{\max} and K_m . In order to check the osmotic effects components by salinity, it was observed that PEG and Mannitol caused a competitive inhibition, increasing the K_m (from 3.01(control) to 6.21 7.35 for PEG and Mannitol, respectively) and maintaining V_{\max} below the control. The NaCl inhibitory effect was more intense on NO_3^- uptake low affinity system (60%) than on the high-affinity system (45%). The NaCl and mannitol effects on the high affinity system, both in 100 mM, were similar to each other inhibition type: V_{\max} reduced both and increased the K_m . When NaCl, PEG and mannitol isosmotic concentrations were tested ($\Psi_{os} = -0.23$ MPa), it was found that the first two induced efflux increases (15 and 34% respectively), whereas, unexpectedly, Mannitol caused a reduction of 40%, all compared to control. In conclusion, the salinity caused reduction in net NO_3^- uptake in cowpea roots through reduction in the influx and efflux increases. In the influx, there is a non competitive inhibition with the Cl^- in both low and high affinity systems. Apparently, the osmotic component is more important inhibiting the NO_3^- uptake, but apparently, the salt type (ions) also interferes in the process. Meanwhile, more studies are needed to shed light on the mechanisms involved in inhibition.

I – INTRODUÇÃO

A salinidade é responsável por grandes perdas nas produções agrícolas no mundo. O problema é mais grave nas regiões áridas e semi-áridas. Além disso, com o uso intensivo da irrigação, a salinização dos solos tende a aumentar, particularmente, nas regiões com condições de altas taxas de evaporação, águas de baixa qualidade e técnicas não apropriadas de manejo da água e do solo. A salinidade é caracterizada pelo excesso de íons os quais causam desequilíbrios nas propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo. Como consequência destes fatores, a disponibilidade de nitrato poderá ser diminuída devida redução na atividade microbiana.

O excesso de íons que causam a salinidade e que interferem no crescimento e desenvolvimento das plantas provoca vários efeitos, dentre eles, diminui potencial osmótico da solução, fazendo com que o solo retenha mais água, disponibilizando-a em menor quantidade para a planta. Em paralelo, ocorre também a interação iônica, caracterizados pela competição de íons pelos mesmos sítios de absorção na membrana plasmática.

O grau com que cada um dos componentes da salinidade afeta o crescimento depende de fatores intrínsecos da planta (genótipo, estágio de desenvolvimento etc), fatores relacionados à natureza da salinidade (tipo de sais, intensidade, duração e forma de aplicação do estresse) e fatores ambientais (luz, temperatura, umidade relativa do ar e sistema de cultivo), bem como da interação entre eles.

O nitrogênio é o nutriente mineral que mais freqüentemente limita o crescimento das plantas, sendo nitrato a principal forma de N disponível nos solos agrícolas. A absorção de NO_3^- pelas plantas representa principal forma do uso do N pelas culturas agrícolas. Esse processo é afetado por diversos fatores do solo, dentre eles a presença de sais em excesso. Apesar de a salinidade provocar reduções nas taxas de absorção de nitrato, pouco é conhecido sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos ao nível de membrana plasmática, especialmente em leguminosas e a cultura do feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] em particular.

A absorção de nitrato é um processo dependente da relação influxo/efluxo de NO_3^- ao nível de membrana. O influxo de nitrato é um processo ativo, dirigido pelo

gradiente de H^+ e catalisado por uma combinação de sistemas de transporte de alta e baixa afinidade (HATS e LATS, respectivamente). O efluxo de nitrato pode também ser um processo induzido por substrato e que requer a transcrição de RNAs e a síntese de proteína(s).

As reações que conferem o processo de influxo de NO_3^- descrevem um sistema saturável, onde à medida que a concentração de NO_3^- no meio aumenta, a velocidade inicial se reduz tendendo à saturação. Desta forma, a cinética de influxo de NO_3^- pode apresentar um modelo típico descrito por uma equação análoga à de Michaelis-Menten, onde se pode estimar a sua velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m). Assim, através desse modelo pode-se estimar o tipo de inibição que ocorre quando o influxo de NO_3^- vem acompanhado de alguns íons causadores de estresse salino.

A caracterização da cinética do nitrato em raízes de plantas ainda é um processo pouco conhecido, considerando que maior parte dos íons presentes no solo é absorvida pelas raízes através da membrana plasmática de células da epiderme e do córtex da raiz, principalmente em regiões mais jovens. Além da caracterização cinética, outro aspecto importante e de pouco conhecido é a relação com inibidores específicos da absorção, principalmente em condições de solos salinos.

Tendo em vista que a salinidade ocasionada por alguns íons pode afetar o processo de absorção (influxo e efluxo) de nitrato, e que este processo é fundamental para o crescimento e produção das plantas, o presente estudo pretende utilizar o feijão caupi como modelo para avaliar o efeito da salinidade induzida por NaCl e outros sais e agentes osmóticos sobre os processos de influxo e efluxo de NO_3^- em raízes de feijão caupi, com o intuito de caracterizar a cinética da absorção.

II – HIPÓTESE E OBJETIVOS

HIPÓTESE

A salinidade causada por excesso de Na^+ e Cl^- inibe a absorção de nitrato através de um mecanismo iônico competitivo com o Cl^- . Em adição, a absorção é mais inibida no sistema de baixa afinidade do que no de alta afinidade. A componente osmótica da salinidade exerce uma influencia baixa sobre o processo de absorção de nitrato em raízes de feijão caupi.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar a cinética de absorção líquida de NO_3^- (influxo e efluxo) na presença de diferentes concentrações de NaCl e comparar com a cinética na presença de outros sais (KCl e Na_2SO_4) e de agentes osmóticos (PEG e Manitol), no sentido de elucidar o tipo de inibição assim como a contribuição das componentes iônicas e osmóticas.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Verificar a relação entre influxo de NO_3^- , doses de NaCl e acumulação de Cl^- em raízes destacadas de feijão caupi;
- Caracterizar a cinética dos sistemas de influxo e de efluxo de nitrato na presença de 0, 50 e 100 mM de NaCl, utilizando raízes destacadas oriundas de plantas pré-tratadas ou não com as mesmas concentrações de NaCl;
- Caracterizar a cinética de efluxo de nitrato na presença de agentes osmóticos, PEG e Manitol, comparando com o NaCl;
- Determinar o tipo de inibição causado por NaCl no influxo dos sistemas de alta e de baixa afinidade de nitrato (calcular K_m e V_{max});
- Comparar as características cinéticas do influxo dos sistemas de alta e baixa afinidade de nitrato na presença de outros sais (KCl e Na_2SO_4) e de agentes osmóticos (PEG e Manitol);
- Analisar comparativamente os resultados.

III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – A Cultura do Feijão caupi no Brasil

O feijão caupi, também conhecido como feijão-de-corda ou *Vigna unguiculata* (L.) Walp, é uma leguminosa dicotiledônea comestível, dotada de alto conteúdo protéico, boa capacidade de fixação de nitrogênio, sendo ainda, pouco exigente em fertilidade do solo. Trata-se de alimento básico para a população, e representa o principal cultivo na maioria dos municípios das regiões Norte e Nordeste do Brasil, constituindo a principal fonte de proteínas de origem vegetal nessas regiões, sendo também amplamente distribuído no mundo (Araújo & Watt, 1988).

O feijão caupi pertence à família *Leguminosae*, tribo *Phaseolae*, subtribo *Phaseolinae* e ao gênero *Vigna*. Colocada em sua primeira classificação botânica como pertencente ao gênero *Phaseolus* ou *Dolichos*. Hoje é classificada e aceita mundialmente como *Vigna* (Freire Filho, 1988). Esse gênero foi dividido em sete subgêneros, consistindo de várias espécies e, dentre elas, está a *Vigna unguiculata*, amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais como formas selvagens e cultivadas (Marechal et al., 1988). A sua origem está ligada, provavelmente, ao continente africano, mas no Brasil, encontrou boas condições de clima e solo para a sua adaptação.

Dadas as grandes qualidades do feijão caupi, em termos nutricionais superiores aos feijões comuns (*Phaseolus* spp.), e o seu relativamente baixo custo de produção (Araújo & Watt, 1988), parece relevante aumentar a produção, comercialização e difusão desta importante cultura, não só para o Norte e Nordeste, mas também para as demais regiões do País, que possuem uma população com sérias carências protéicas e alimentares. Portanto, a importância do feijão caupi para o Brasil, e, em particular, para o Norte e Nordeste onde sua produção está mais adaptada e não se

restringe apenas, aos aspectos propriamente sociais, por ser alimento básico rico em proteínas, e por estar ligado aos pequenos agricultores. Mas envolve, potencialmente, um leque maior de aspectos econômicos como, por exemplo, uma integração do processo produtivo, como tal, ao complexo agroindustrial (Pinto, 1998).

Apesar desta espécie apresentar características de tolerância para condições de deficiência hídrica, estresse salino e elevadas temperaturas, evidentemente, o feijão caupi responde com maior produtividade em condições ideais de disponibilidade de água, nutrição e temperatura. Assim, pesquisas de melhoramento vêm sendo desenvolvidas visando ao aumento da resistência desta cultura às condições de seca e salinidade do semi-árido nordestino (Martins Miranda, 2002). Embora, o feijão caupi apresente algumas respostas às condições de estresse ambiental (abiótico) e possua grande potencial de ajustamento a essas condições, são ainda relativamente recentes e escassos os trabalhos encontrados na literatura sobre o comportamento fisiológico, efeitos e mecanismos bioquímicos referentes à tolerância ao estresse hídrico e à salinidade.

Os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijão caupi na região semi-árida são os baixos níveis tecnológicos utilizados (sementes não melhoradas geneticamente, preparo e correção dos solos, etc), associados com as condições ambientais desfavoráveis, tais como baixa disponibilidade de água no solo, temperaturas elevadas e presença de salinidade nos solos (Araújo & Watt, 1988). No Nordeste brasileiro, as águas utilizadas na irrigação apresentam, na maioria das vezes, concentração de sais na faixa de 1 a 30 mmolc L⁻¹ correspondendo à faixa de condutividade elétrica de 0,1 a 3,0 dS m⁻¹ (Holanda & Amorim, 1997). De acordo com os dados obtidos pela FAO (2000), o feijão caupi pode tolerar irrigações com água salinas com condutividade elétrica de até 3,3 dS m⁻¹ (Ayers & Westcot, 1999), sendo considerada então como uma espécie moderadamente tolerante à salinidade (Silveira et al, 1999). No entanto, Dantas et al. (2002) afirmam que o grau de tolerância do caupi ao estresse salino varia entre genótipos.

A cultura do feijão caupi é amplamente cultivada pelos produtores das regiões mais pobres do Brasil e tem sido crescente a sua comercialização, embora requeira, ainda, maiores avanços técnicos da produção. Estima-se que a área cultivada com caupi no Brasil é, de aproximadamente um milhão de hectares, dos quais cerca de 900 mil (90%) estão situados na região Nordeste do Brasil (Lima et al., 2007). Apesar de o

feijão caupi apresentar tolerância a condições de seca e de temperaturas elevadas, principalmente durante sua fase vegetativa, observa-se que a cultura é muito mais sensível a esses estresses durante a fase reprodutiva (Turk & Hall, 1980).

Uma vez conhecida a sua grande importância sócio-econômica, observa-se que sua produtividade na região semi-árida do Brasil alcança valores extremamente baixos, em termos de potencial genético-fisiológico dessa leguminosa, sendo o efeito da salinidade uma das principais causas para esta baixa produção (Dantas et al., 2002).

3.2 – Salinidade dos solos e suas conseqüências sobre as plantas

A salinidade é o principal fator do meio ambiente que limita o crescimento vegetal e a produtividade de plantas (Allakhverdiev et al., 2000). Os efeitos prejudiciais da alta salinidade em plantas podem ser observados em nível de planta inteira, que vão desde os decréscimos da produtividade até a morte. Muitas plantas desenvolvem mecanismos para excluir o sal das células ou de tolerar sua presença no interior das células. Durante o aparecimento e desenvolvimento do estresse salino no âmbito de uma planta, todos os principais processos como a fotossíntese, síntese de proteínas e o metabolismo lipídico são afetados.

O solo contém normalmente uma solução muito diluída de sais, que, ao serem absorvidos pelas raízes, promoverá uma série de reações, dentre elas, a nutrição mineral das plantas. Os sais que constituem a solução do solo consistem em grande parte e em proporções variadas, dos cátions Na^+ , Ca^{2+} , e Mg^{2+} e dos ânions Cl^- e SO_4^{2-} . O cátion K^+ e os ânions HCO_3^- , CO_3^- e NO_3^- , geralmente são encontrados em baixas concentrações (Daker, 1988). O excesso destes íons reduz o potencial osmótico da solução do solo e aumenta a sua condutividade elétrica (CE), de forma que um solo é considerado salino quando a CE do seu extrato saturado é superior a $4,0 \text{ dS.m}^{-1}$. Adicionalmente, pode ocorrer o fenômeno de desestruturação do solo, o qual é decorrente da saturação do complexo de troca pelo Na^+ que, ao substituir os cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} , conduz à dispersão das argilas e torna a porosidade do solo quase nula (Richards, 1974).

A salinização dos solos pode ter diversas origens, sendo que os fatores naturais que mais podem contribuir para o processo da salinização dos solos são os materiais de origem e o clima (Daker, 1988). O Intemperismo de rochas primárias solúveis pode liberar sais de vários tipos, principalmente cloretos de sódio, cálcio e magnésio, e em

menores concentrações, carbonatos e sulfatos. O Cloreto de sódio é o mais solúvel e abundante sal liberado. A outra causa da acumulação é a deposição oceânica de sais transportada pelo vento e chuva. As chuvas pluviais contêm 6-50 mg/kg de cloreto de sódio; Esta concentração diminui com a distância da costa. Chuvas contendo 10 mg NaCl.L⁻¹ de chuva podem depositar 10 kg/ha de sal para cada 100 mm de chuva por ano (Munns et al., 2008).

Mais de 800 milhões de hectares de terras ao longo de todo o mundo são afetados pela salinidade (FAO, 2007). Esta quantidade representa mais de 6% do total da superfície terrestre mundial. A maioria destas terras afetadas por sais surgiu a partir de causas naturais, a partir da acumulação de sais durante longos períodos em zonas áridas e semi-áridas (Rengasamy, 2002). A salinização dos solos é particularmente evidente nas regiões áridas e semi-áridas, atingindo cerca de 30% das áreas irrigadas. Dados da FAO (2000) indicam que o mundo perde cerca de 1,5 milhões de hectares de terras aráveis a cada ano devido ao acúmulo de sais e no Brasil, estima-se que 20 a 25% das áreas cultivadas enfrentam problemas de salinização.

O problema da salinidade é mais conspícuo na região Nordeste, a qual possui uma área de 155 milhões de hectares, sendo que 52% dessa superfície são semi-áridas (Lira et al, 1982). Considerando que a prática da irrigação constitui a melhor maneira de garantir a produção agrícola com segurança no semi-árido e que a implantação dos projetos de irrigação tem sido incrementada nas últimas décadas, este problema configura-se como de grande importância para a produção agrícola nessa região, face às projeções futuras de aumento da produção e da demanda por alimentos (Azevedo Neto, 2005).

Os efeitos da salinidade sobre as plantas já tem sido foco de pesquisas nos últimos anos, em virtude do sal inibir o crescimento das plantas em grandes áreas do globo, mais do que qualquer outra substância inibidora presente no ambiente normal (Epstein, 1975).

A inibição do crescimento das plantas pelo estresse pode ser consequência dos efeitos osmóticos, provocando déficit hídrico e/ou da acumulação excessiva de íons, que pode causar toxicidade, desequilíbrios nutricionais ou ambos (Greenway & Munns, 1980). Entretanto, o grau com que cada um destes componentes do estresse salino afeta o crescimento depende de fatores intrínsecos da planta (genótipo e estágio de desenvolvimento), fatores relacionados com o estresse (tipo de salinidade, intensidade,

duração e forma de aplicação do estresse) e fatores ambientais (luz, temperatura, umidade relativa do ar e sistema de cultivo), bem como da interação entre eles (Cramer et al., 1994; Bray et al., 2000).

Os efeitos da salinidade no crescimento e desenvolvimento das plantas são assim enumerados: 1º- efeito osmótico, posto que uma elevada concentração salina diminui o potencial osmótico do solo, fazendo com que este retenha mais água, disponibilizando-a em menor quantidade para a planta (Gheyi, 2000); 2º- efeitos tóxicos, caracterizados pelo acúmulo de íons específicos na planta. Por exemplo, um excesso de Na^+ e de Cl^- no protoplasma ocasiona distúrbios, afetando a fotofosforilação, a cadeia respiratória, a assimilação de nitrogênio e o metabolismo das proteínas. Esses íons começam a inibir a maioria das enzimas envolvidas nesses processos, a uma concentração acima de 100 mM (Larcher, 2000; Munns, 2002); 3º- efeito nutricional, no qual o excesso de um íon no solo inibe a absorção de outros íons; por exemplo, quando a concentração de Na^+ e Cl^- no solo é alta, a absorção de nutrientes minerais, especialmente NO_3^- , K^+ e Ca^{2+} é quase sempre reduzida (Marschner, 1995).

Uma ênfase da importância do efeito osmótico é válida devido aos processos que pelo qual o potencial hídrico pode ser diminuído sem que haja decréscimo da turgescência ou do volume celular e resulta do aumento líquido no conteúdo de solutos na célula (Taiz & Zeiger, 2004). O fenômeno de ajustamento osmótico é mantido pela acumulação e perda regulada de íons inorgânicos e de solutos orgânicos de baixa massa molecular (Strange, 2004), tornando possível a manutenção da absorção de água e da pressão de turgescência da célula o que pode contribuir para a manutenção de processos fisiológicos, tais como: abertura estomática, fotossíntese, alongamento e divisão celulares (Serraj & Sinclair, 2002). O ajustamento osmótico representa, assim, um importante mecanismo de aclimatação das plantas às condições de seca ou salinidade (Taiz & Zeiger, 2004).

É necessário destacar que, entre as espécies vegetais e dentro de cada espécie, pode-se encontrar variabilidade genética em relação à tolerância à salinidade (Ayers & Westcot, 1999), a qual pode estar relacionada com diferenças em respostas morfo-fisiológicas (Kuiper, 2000; Niu et al., 1995; Moya et al., 1999; Storey, 1995; Lacerda et al., 2003). A Espécie [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] feijão caupi é considerada moderadamente tolerante (Silveira et al, 1999; Fageria & Gheyi, 1997; Ayers & Westcot, 1999), refletindo, provavelmente, as variabilidades nos graus de eficiência dos

mecanismos de aclimatação ou adaptação ao excesso de sais no solo. Em muitas espécies o Na^+ e Cl^- são efetivamente excluídos da parte aérea através de retenção nas raízes independente da transpiração (Munns, 2005). Ao contrário, nas plantas halófitas, constituintes da flora natural de solos altamente salinos, esse mecanismo geralmente não existe, ocorrendo grande acumulação de íons salinos nas folhas.

De modo geral, as plantas têm duas alternativas para crescer e se reproduzir em ambientes salinos: 1) evitar o acúmulo excessivo de sais, principalmente no tecido fotossintetizante; 2) acumular sal no tecido fotossintetizante, porém de forma compartimentalizada, evitando que os mesmos atinjam os processos e as funções essenciais do vegetal. No caso das halófitas, há compartimentalização eficiente de íons inorgânicos no vacúolo acompanhado do acúmulo de solutos orgânicos compatíveis no citoplasma, os quais mantêm o equilíbrio osmótico entre os compartimentos celulares (Hasegawa et al., 2000).

3.3 – Absorção e transporte de NO_3^- em plantas

O nitrogênio é fundamental para o crescimento e desenvolvimento de todas as plantas cultivadas que o requerem em grandes quantidades. Normalmente, o nitrogênio é absorvido da solução do solo, na forma de íons de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) (Smith & Gallon, 1993). De todos os elementos químicos necessários às plantas, o nitrogênio (N) é o que é requerido em maiores quantidades, perfazendo 2% de sua massa seca total (Miller & Cramer, 2004). Além da sua grande importância, o N tem como principal fonte o NO_3^- , sendo a forma mais abundante do que o NH_4^+ em torno das raízes. Entretanto, a solução do solo frequentemente apresenta baixas concentrações de NO_3^- , o que limita o crescimento da planta (Silveira & Crocomo, 1985). Ao ser absorvido pelas raízes, o nitrato é transportado para as partes em crescimento da planta. Por fim, o nitrogênio é armazenado nas sementes e nas culturas agronomicamente importantes, como os cereais e as leguminosas, que são de considerável valor comercial.

Em resposta aos diversos habitats, as plantas evoluíram múltiplas estratégias para adquirirem o nitrogênio, dentre elas, a absorção de nitrato e a fixação do nitrogênio. Em muitos solos, especialmente aqueles com cultivos anuais, o nitrato é a fonte mais abundante de nitrogênio, sendo que, sua concentração no solo varia entre 1 e 5 mM, podendo alcançar valores de até 5 μM , em consequência de sua ampla utilização

pelas plantas e microrganismos e, adicionalmente, de sua lixiviação do solo (Miller & Cramer 2004). Na agricultura, baseada em altas produtividades, pressupõe elevadas aplicações de insumos, a fim de suprir a demanda nutricional das plantas. O nitrogênio é, normalmente, o nutriente mineral mais abundante no tecido vegetal, refletindo a alta exigência em N das culturas. Entretanto, segundo Mortvedt et al. (1999), a eficiência no aproveitamento do fertilizante nitrogenado adicionado ao solo, em particular nas regiões tropicais, está em torno de 50-70%, fazendo com que parte do investimento em adubação não tenha o retorno esperado.

A variação do nível de nitrato no solo pode afetar a taxa de crescimento e a concentração de nitrato armazenada nas plantas. Quando fornecidos grandes concentrações de NO_3^- no solo, as concentrações na raiz e parte aérea podem atingir até 100 mM, mais do que é armazenado no interior dos vacúolos (Miller & Smith, 1996).

O íon NO_3^- também serve como um importante sinalizador para o crescimento de plantas, em função da alteração de seu metabolismo e pela indução de genes nas vias de assimilação do nitrato. Estes genes codificam os transportadores que reconhecem o nitrato da solução do solo e enzimas específicas convertem o nitrato a amônio dentro das células (Von Wiren et al., 2000). Outros dados sugerem que o nitrato pode ser um sinalizador para a regulação do metabolismo do carbono, por exemplo, pela modulação da expressão de genes envolvidos na biossíntese de ácidos orgânicos (Scheible et al., 1997).

O NO_3^- presente no solo é absorvido pelas raízes através da membrana plasmática de células da epiderme e do córtex da raiz, principalmente em regiões mais jovens (Taiz & Zeiger, 2004). O NO_3^- absorvido poderá tomar quatro destinos: (a) ser imediatamente reduzido por ação de enzimas como redutase de nitrato (RN) e redutase de nitrito (RNi). A amônia produzida por RNi será assimilada pela via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase) (Lea, 1997); (b) A segunda alternativa será a mobilização do NO_3^- das raízes para a parte aérea, a partir do descarregamento no xilema. (c) O terceiro caminho será o influxo do nitrato para os vacúolos das raízes ou de outra parte vegetativa, constituindo o “pool” de armazenamento; e (d) sofrer efluxo para o apoplasto, através da membrana plasmática (Taiz & Zeiger, 2004; Lea, 1993; Forde, 2000). A fração de nitrato no citosol é bastante pequena, a qual constitui o “pool” metabólico, que é ativo para a indução de síntese de proteínas e atividade de RN (Deng et al., 1991).

A absorção líquida de NO_3^- nas raízes é dada pelo balanço de influxo e efluxo através da membrana plasmática (Morgan et al., 1973), isto foi proposto por Mackown et al. (1983) que são dois tipos de pools de armazenamento para nitrato em raízes, sendo um associado com a translocação para o xilema, e o outro ligado ao efluxo das raízes e possivelmente uma subsequente redução. A redução de nitrato é aproximadamente associada com a absorção em célula, ocorrendo durante ou imediatamente depois de seu transporte através da plasmalema (Mackown et al., 1983; Morgan et al., 1985). A absorção e redução não são obrigatoriamente processos acoplados (Morgan et al., 1985) assim como originalmente propostos por Butz e Jackson (1977). O processo de absorção ocorre por meio de um co-transporte na proporção 1 NO_3^- para 2 H^+ , dirigido pelo gradiente de prótons (ΔH^+) gerado pelas ATP-ases da membrana plasmática, sendo, portanto, dependente de ATP (Forde, 2000).

Ao longo dos últimos anos, os estudos sobre cinética de absorção evidenciaram que as raízes possuem pelo menos três sistemas de transportes de NO_3^- . O sistema de transporte constitutivo de alta afinidade (CHATS) é caracterizado por valores baixos de ambos os K_m e V_{max} . O sistema de transporte induzido de alta afinidade (IHATS), com valores mais elevados de k_m e V_{max} . Por último, o sistema de transporte constitutivo de baixa afinidade (LATS) que pode contribuir significativamente para a absorção de nitrato em concentrações superiores a 1 mM, que são saturáveis em concentrações tão elevadas como 50 mM de NO_3^- . Avaliações termodinâmicas demonstram que a absorção em LATS também é ativa, apesar da resposta linear para a concentração (Williams & Miller, 2001; Glass & Siddiqi, 1995).

Devido à salinidade interferir na absorção e assimilação de NO_3^- , diferentes autores tem relatado que a absorção de NO_3^- é inibida pela salinidade, o que resulta em níveis reduzidos deste íon nos tecidos (Gouia et al., 1994; Silveira et al., 2001; Parida e Dias, 2005). Em plantas de cevada, a taxa de absorção foi afetada na presença de NaCl e Na_2SO_4 (Aslam et al., 1984). Em Plantas de feijão caupi tratadas com 100 mM de NaCl exibiram uma grande sensibilidade nos processos de absorção e assimilação de NO_3^- (Silveira et al., 1999). Quando as plantas de feijão caupi foram pré-aclimatadas com 50 mM de NaCl, foi evidenciada uma homeostase entre a aquisição de N e o crescimento da planta durante a exposição de curta duração ao NaCl, sendo afetada também a absorção e a assimilação de NO_3^- (Silveira et al., 2001). Este efeito deletério da salinidade sobre a absorção de NO_3^- está mais relacionado à competição direta do íon

Cl⁻ pelos sítios transportadores de NO₃⁻ do que com a taxa diminuída de transpiração (Cerezo et al., 1999).

3.4 – Influxo e efluxo de NO₃⁻ em plantas

A absorção líquida de NO₃⁻ pelas plantas é diferença entre influxo e efluxo de NO₃⁻ através da membrana plasmática das células radiculares (Morgan et al., 1973). O influxo de nitrato é um processo ativo, dirigido pelo gradiente de H⁺ e catalisado por uma combinação de sistemas de transporte de alta e baixa afinidade (HATS e LATS, respectivamente) (Fored, 2000; Galván et al., 2001; Glass et al., 2001). Alguns autores afirmam ser o processo de influxo de NO₃⁻ através da membrana plasmática das células corticais e epidérmicas da raiz, a etapa mais importante de assimilação (Daniel et al., 1998 ; Gojon et al., 1998). A contribuição relativa do influxo e efluxo na absorção líquida dependem antes de tudo, da disponibilidade de NO₃⁻ no meio. Dados já reportados mostraram que o influxo foi independente do pré-tratamento com NO₃⁻ (Glass et al., 1985). Porém, estudos posteriores indicaram que o influxo de NO₃⁻ é extremamente regulada seguindo a acumulação de NO₃⁻ em raízes (King et al., 1993).

Influxo e efluxo de NO₃⁻ são processos independentes que são regulados por diferentes mecanismos. O efluxo é estimulado e o influxo é inibido (Aslam et al., 1996). O efluxo de nitrato pode também ser um processo induzido por substrato que requeira a transcrição de RNAs e a síntese de proteínas. Ao contrário do sistema de absorção, entretanto, o sistema de efluxo, uma vez induzido, é relativamente estável na presença de inibidores de síntese de proteína e RNA contanto que os íons nitrato ou nitrito estejam presentes (Aslam, et al., 1996).

O influxo de ânions em LATS e HATS ocorre através da acoplação de prótons, por mecanismos simportes eletrogênicos (Em geral ocorre 1 ânion/2H⁺ estequiometricamente, (Britto & Kronzucker, 2005), enquanto que o efluxo de ânion em LATS e HATS é catalisada por canais de ânions, que são eletrogênicos (Diatloff et al., 2004).

Quando plantas são previamente cultivadas em solução contendo baixas concentrações de NO₃⁻ (abaixo de 1 mM) ou na ausência de nitrato e em seguida são transferidas para soluções contendo altas concentrações de nitrato (1-20 mM), observa-se uma fase de baixíssimas taxas de absorção, por aproximadamente 1 hora, seguida de

uma intensa aceleração na absorção durante algumas horas (Pilbeam & Kirby, 1990). A existência dessa fase sugere um processo de indução por nitrato na síntese de uma proteína transportadora de NO_3^- na plasmalema (Lea, 1993).

Em plântulas de cevada crescidas continuamente na presença de nitrato, se observou uma resposta típica para a cinética de Michaelis-Menten. As taxas de absorção, entretanto, foram dependentes do tipo de pré-tratamento com NO_3^- , sugerindo que o sistema de transporte foi induzido por nitrato. Em plantas que não foram submetidas ao pré-tratamento com nitrato observou-se baixas respostas ao NO_3^- em faixas de baixas concentrações (abaixo de 0,2 mM). Porém, acima desse valor, observou-se que a taxa de absorção aumentou linearmente (Lea, 1993). Os dados sugerem que a absorção de nitrato é conduzida por dois sistemas: um sistema saturável a baixas concentrações, de alta afinidade e induzido por nitrato, e outro sistema não saturável de altas concentrações, de baixa afinidade (Lea, 1993). Britto e Kronzucker. (2006), ilustraram o papel substancial do efluxo na aquisição de nutrientes pelas plantas crescidas sob condições de transporte de baixa afinidade. Dentre os íons analisados, o NO_3^- apresentou um aumento da relação influxo/efluxo na medida em que a concentração externa de NO_3^- aumentou.

Em baixas concentrações de NO_3^- , o sistema operante é o HATS, que possui uma característica típica de Michaelis-Menten. Já com o aumento da concentração no meio externo, opera o de baixa afinidade (LATS). Porém, a natureza deste último ainda é um assunto em debate. (Peuke & Jeschke, 1999).

Os princípios gerais das reações químicas se aplicam às reações catalisadas por enzimas e a equação de Michaelis-Menten é a equação básica da cinética enzimática, que descreve uma hipérbole retangular (Voet et al., 2000). Porém esta aplicação mostra-se também em aspecto distinto que não se observa em reações não-enzimáticas, como por exemplo, as funções de saturação com o substrato. Um exemplo disso é a cinética da absorção de NO_3^- dependente das concentrações de nitrato. Baseado nestes princípios e na teoria geral da ação enzimática e cinética, L. Michaelis e M.L. Menten descobriram uma forma de analisar os aspectos da cinética enzimática e inibição de uma reação na qual existe somente um substrato. A partir desses aspectos, eles desenvolveram a velocidade máxima de uma reação (V_{\max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) que nos permite caracterizar o tipo de inibição ocorrida na reação. As inibições são classificadas em: competitiva, onde uma substância compete diretamente com o

substrato normal pelo sítio ativo de ligação. Esse inibidor normalmente é semelhante ao substrato, de modo que se liga especificamente ao sítio ativo, mas difere-se do substrato por não reagir com ele. Neste tipo de inibição, o valor de K_m aparente aumenta e V_{max} não aumenta; incompetitiva, onde a substância inibidora não compete pelo sítio ativo da ligação, mas liga-se diretamente ao complexo formado pelo substrato. O gráfico dos duplos-recíprocos consiste de linhas paralelas e as constantes K_m e V_{max} diminuem; mista, onde a substância liga-se aos sítios que participam tanto da ligação com o substrato quanto do complexo formado pelo mesmo. Dentro deste tipo de inibição, existe um modelo classificado como não-competitivo, onde o gráfico duplo-recíproco mostra um V_{max} decrescente e um K_m praticamente inalterado na presença do inibidor (Voet et al., 2000; Lehninger, 1976). Na inibição do tipo mista, podem ocorrer modificações que são moduladas na presença do inibidor, alterando V_{max} e K_m .

Em função das características das reações enzimáticas, o influxo de NO_3^- pode ser representado pela cinética da absorção líquida de NO_3^- . Alguns autores já relacionaram o processo de absorção de NO_3^- com a salinidade, mas o influxo de NO_3^- na presença de sal ainda é pouco conhecido. Peuke & Jeschke, 1999, mostraram que a inibição da absorção pelo sal é um efeito osmótico. Em seus experimentos, a presença de sal em sistema de transporte de alta afinidade (HATS) provocou uma inibição caracterizada como não competitiva, de acordo com as constantes K_m e V_{max} de Michaelis-Menten. Já em sistema de transporte de baixa afinidade (LATS) também foi inibida, mas não foi explanado o tipo de inibição ocorrida.

IV – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material vegetal e Germinação

Em toda a fase experimental, foram utilizadas plantas de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], cultivar Pitiúba, fornecidas pelo Setor de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFC. As sementes foram germinadas sob condições controladas em sistema de rolo de papel germitest (Vieira e Carvalho, 1994). Inicialmente, as sementes foram desinfetadas com NaClO 0,2 % (m/v) por 5 min, sob agitação eventual. Estas sementes foram lavadas três vezes em água destilada deionizada e, em seguida, embebidas por uma hora. Após a embebição, as sementes foram distribuídas em folhas de papel germitest (280 x 380 mm) previamente umedecidas com água destilada deionizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. Dez sementes foram distribuídas em fileira, no terço superior de duas folhas sobrepostas. Uma terceira folha umedecida foi utilizada para cobrir as sementes e as três folhas foram enroladas. Três rolos individuais, contendo dez sementes cada, foram enrolados com uma folha umedecida adicional. Este sistema foi coberto com dois sacos plásticos transparentes desinfetados com etanol 70% (v/v), os quais ficaram dispostos em direções opostas e afixados com atilho na região central do sistema, formando um cartucho. Assim, os cartuchos ficaram dispostos em câmara de crescimento na posição vertical, sendo incubados a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 h e radiação fotossinteticamente ativa aproximada de $240 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, durante quatro dias.

4.2 – Local e condições da fase inicial da condução das plantas

A fase inicial da condução das plantas foi realizada em condições de casa de vegetação, do laboratório de Metabolismo de plantas – (LABPLANT) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza-CE, cuja localização é de latitude 3° 44' sul e longitude 38° 33' W e clima local do tipo AW' na classificação de Koeppen. O período experimental foi compreendido entre os meses de Setembro 2007 a Junho de 2008. Durante o experimento as condições ambientais, no interior da casa de vegetação, foram: fotoperíodo de 12 horas, temperaturas médias correspondentes a 31°C durante o dia e 24°C durante a noite e 55% de umidade relativa média durante o dia e 75% à noite.

4.3 – Transplante para solução nutritiva

Após quatro dias de germinação, as plântulas em estágio de gancho plumular, foram transferidas para vasos com capacidade para 12 L contendo solução nutritiva de Hoagland modificada (ausência de amônio) e diluída $\frac{1}{4}$ na primeira semana: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2= 2 \text{ mM}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4= 1 \text{ mM}$, $\text{MgSO}_4= 1 \text{ mM}$, $\text{KNO}_3= 6 \text{ mM}$, $\text{K}_2\text{SO}_4= 2 \text{ mM}$, Fe-EDTA 0,1 mM, HBO_3 40 μM , MnCl_2 9 μM , CuSO_4 3 μM , ZnSO_4 7 μM e Na_2MoO_4 0,1 μM , pH 6,0. O sistema hidropônico foi equipado com aeradores promovendo a circulação do ar e a constante movimentação da solução nutritiva nos vasos. A estrutura utilizada como suporte das plântulas foi uma lâmina de isopor (largura 15 mm). Sob estas condições, as plântulas foram mantidas em crescimento durante sete dias.

4.4 – Condução dos experimentos

4.4.1 – Experimento 1: Cinética de influxo líquido de NO_3^- e acumulação de Cl^- em raízes destacadas de feijão caupi expostas a diferentes concentrações de NaCl

As plantas transplantadas foram crescidas durante sete dias em solução nutritiva, sendo que, no 3° dia, a solução foi renovada e modificada pela exclusão de NO_3^- , objetivando o esgotamento do mesmo nas raízes. As plantas permaneceram com a nova solução durante quatro dias para um período de aclimatação sem nitrato. Os sais

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e KNO_3 foram substituídos por CaCl_2 e K_2SO_4 no sentido de manter constante as concentrações de Ca^{+2} e de K^+ nas plantas supridas na ausência de nitrato.

Neste experimento, as raízes foram destacadas no laboratório e lavadas em solução de CaCl_2 0,1 mM à temperatura ambiente por 30 min para a eliminação do excesso de NO_3^- retido na parede celular e apoplasto. Em seguida, duas raízes foram transferidas para erlenmeyers contendo 50 ml de meio de incubação MES 1mM, Tris 0,5 mM, CaCl_2 0,1 mM, KNO_3 5 mM e as respectivas concentrações de NaCl: 0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 mM, pH 6.0 com quatro repetições e incubadas em banho-maria a 30° C sob agitação por 60 min. Para cada repetição utilizou-se duas raízes, obedecendo uma relação massa fresca/volume de 1g de MF de raiz/25 mL de meio.

Após o período de incubação, as raízes foram removidas do meio e postas para secar em estufa a 65° C por 48 horas para posterior determinação da massa seca (MS) e medição da concentração de Cl^- no tecido. A medição do influxo líquido de NO_3^- foi feita através da depleção de sua concentração de nitrato no meio de incubação através de eletrodo seletivo para NO_3^- modelo Seven multi da Mettler Toledo®. O eletrodo foi configurado para expressar as leituras na forma direta de mmol.L^{-1} .

Para a determinação Cl^- em tecido radicular utilizou-se também o método do eletrodo seletivo para cloreto no mesmo aparelho. Para a obtenção do extrato da raiz, utilizou-se a amostra da matéria seca (25 mg) que foram submetidas a extração com 10 mL de água destilada deionizada em banho-maria a 100°C por uma hora. A amostra utilizada para a leitura foi a do extrato diluída 50 vezes com água deionizada. Os dados da cinética do influxo de nitrato e acumulação de Cl^- foram expressos em $\mu\text{mol.de NO}_3^- .\text{g}^{-1}\text{MS.h}^{-1}$ e $\mu\text{mol.de Cl}^- .\text{g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente.

4.4.2 – Experimento 2: Influxo e efluxo acumulado de NO_3^- em raízes destacadas de plantas de feijão caupi previamente tratadas ou não com 50 e 100 mM de NaCl

Para o experimento com absorção acumulada de plantas não tratadas e pré-tratadas, as mesmas foram crescidas durante sete dias em solução nutritiva, sendo que, após o 3° dia a solução foi renovada, porém sem conter NO_3^- , objetivando o esgotamento do mesmo nas plantas. As plantas permaneceram com a nova solução durante quatro dias para um período de aclimação sem nitrato. Os sais $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e KNO_3 foram substituídos por CaCl_2 e K_2SO_4 no sentido de manter constante as concentrações de Ca^{+2} e de K^+ na solução. Em experimento com plantas pré-tratadas

com NaCl, aplicou-se 0, 50 e 100 mM NaCl nos vasos durante 48 horas antes dos ensaios com raízes destacadas.

As raízes foram destacadas e lavadas em solução de CaCl_2 0,1 mM por 30 min. Em seguida, as raízes foram transferidas para frascos contendo meio de incubação MES 1mM, Tris 0,5 mM, CaCl_2 0,1 mM, KNO_3 2 mM pH 6,0 e acrescido dos tratamentos de 0, 50 e 100 mM de NaCl com quatro repetições e incubadas em banho-maria a 30° C por um período de 90 minutos. Alíquotas de 50 μL foram coletadas a cada intervalo de 0, 7, 15, 30, 45, 60 75 e 90 minutos. Após o período de incubação, as raízes foram removidas da solução de incubação e postas para secar em estufa a 65° C por 48 horas para posterior determinação da massa seca (MS). A determinação do influxo de nitrato foi feita pelo método do ultravioleta (Cawse, 1967) em espectrofotômetro, na qual determinou a redução da concentração de NO_3^- na solução externa a cada intervalo de incubação. O resultado do influxo acumulado foi expresso em μmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$.

Para o experimento de efluxo acumulado de NO_3^- , as plantas foram crescidas durante sete dias em solução nutritiva, sendo que, 24 horas antes dos ensaios com raízes, a concentração de NO_3^- foi reposta para 10 mM de NO_3^- na solução, objetivando uma suplementação de nitrato nas plantas. Neste experimento, as plantas de feijão caupi tiveram suas raízes destacadas e retiradas o excesso de umidade suavemente com papel toalha e transferidas rapidamente para erlenmeyers contendo 50 mL de meio de incubação MES 1mM, Tris 0,5 mM e CaCl_2 0,1 mM pH 6,0 e acrescido dos tratamentos de 0, 50 e 100 mM de NaCl com quatro repetições, onde permaneceram por 60 minutos em banho-maria a 30° C. Para cada repetição utilizou-se duas raízes, obedecendo uma relação massa fresca/volume de 1g de MF de raiz/25 mL. Alíquotas de 100 μL foram coletadas a cada intervalo de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos para determinação da concentração de nitrato.

Após período de incubação, as raízes foram removidas da solução de incubação e postas para secar em estufa a 65° C por 48 horas para posterior determinação da massa seca (MS). O efluxo de NO_3^- foi determinado pelo método ultravioleta de Cawse (1967) em espectrofotômetro, na qual determinou o aumento da concentração de NO_3^- da solução externa nos intervalos de tempo estabelecidos. O resultado do efluxo foi expresso em $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{MS}$ de NO_3^- .

4.4.3 – Experimento 3: Caracterização da cinética de efluxo de nitrato na presença de NaCl e de agentes osmóticos (PEG 6000 e Manitol)

As plantas foram crescidas durante sete dias em solução nutritiva, sendo que, 24 horas antes dos ensaios com raízes, a concentração de NO_3^- foi reposta para 10 mM de NO_3^- na solução, objetivando uma suplementação de nitrato nas plantas. Neste experimento, as plantas de feijão caupi tiveram suas raízes destacadas e retiradas o excesso de umidade suavemente com papel toalha. Em seguida, as raízes foram transferidas rapidamente para frascos contendo 50 mL de meio de incubação MES 1mM, Tris 0,5 mM e CaCl_2 0,1 mM pH 6,0 e acrescido dos tratamentos de NaCl (50 e 100 mM de NaCl), Manitol 100 mM e PEG 12%, com quatro repetições, onde permaneceram por 60 minutos em banho-maria a 30° C. Para cada repetição utilizou-se duas raízes, obedecendo uma relação 1g MF raiz/25 mL. Alíquotas de 100 μL foram coletadas a cada intervalo de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos para determinação da concentração de nitrato. Os agentes Manitol, PEG 12% foram calculados para obterem a mesma osmolaridade com o tratamento NaCl 50 mM (Tabela 8, em anexo).

Após o período de incubação, as raízes foram removidas da solução de incubação e postas para secar em estufa a 65° C por 48 horas para posterior determinação da massa seca (MS). O efluxo de NO_3^- foi determinado pelo método ultravioleta de Cawse (1967) em espectrofotômetro, na qual determinou a concentração de NO_3^- da solução externa nos intervalos de tempo estabelecidos. O resultado do efluxo foi expresso em $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$ de NO_3^-

4.4.4 – Experimento 4: Cinética do influxo de NO_3^- para dois sistemas de absorção (alta e baixa afinidade) em raízes destacadas de feijão caupi na presença de NaCl

As plantas transplantadas foram crescidas durante sete dias em solução nutritiva, sendo que, no 3° dia, a solução foi renovada e modificada pela exclusão de NO_3^- , objetivando o esgotamento do mesmo nas raízes. As plantas permaneceram com a nova solução durante quatro dias para um período de aclimatação sem nitrato. Os sais $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e KNO_3 foram substituídos por CaCl_2 e K_2SO_4 no sentido de manter constante as concentrações de Ca^{+2} e de K^+ nas plantas supridas na ausência de nitrato.

Em experimento de baixa afinidade, as raízes de plantas de feijão caupi foram destacadas e lavadas em solução de CaCl_2 0,1 mM à temperatura ambiente por 30 min para a eliminação do excesso de NO_3^- retidas na parede celular e apoplasto.

Posteriormente, as raízes foram transferidas para frascos contendo 50 ml de meio de incubação MES 1mM , Tris 0,5 mM, CaCl₂ 0,1 mM pH 6,0 o qual foi acrescido de concentrações crescentes de NO₃⁻ (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mM de KNO₃) e os tratamentos (0, 50 e 100 mM de NaCl) com quatro repetições cada e incubadas em banho-maria a 30° C por um período de 60 min. Para o sistema de alta afinidade, modificou-se apenas as concentrações de NO₃⁻ para 0, 0,1; ,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mM de KNO₃ e os tratamentos 0, e 100 mM de NaCl com quatro repetições cada e incubadas em banho-maria a 30° C por um período de 60 min.

Após o período de incubação, as raízes foram removidas da solução de incubação e postas para secar em estufa a 65° C por 48 horas para posterior determinação da massa seca (MS). A verificação do influxo foi feita por eletrodo seletivo para NO₃⁻ modelo Seven multi da Mettler Toledo®. O influxo de NO₃⁻ foi determinado através da diferença entre a concentração inicial menos a concentração final de NO₃⁻ das soluções nos frascos e os resultados foram anotados após prévia calibração do aparelho. O eletrodo foi configurado para expressar as leituras na forma direta de mmol.L⁻¹.

A cinética da absorção de nitrato foi avaliada pelo seu influxo sob condições de ausência e presença de salinidade por NaCl. Os dados da cinética do influxo de nitrato foram expressos em $\mu\text{mol.de NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}\text{MS} \cdot \text{h}^{-1}$. O gráfico foi elaborado com o auxílio do programa Sigma-Plot® 10, onde a regressão não-linear permitiu um ajuste à função do tipo hipérbole retangular.

4.4.5 – Experimento 5: Cinética do influxo de NO₃⁻ para dois sistemas de absorção (alta e baixa afinidade) em raízes destacadas de feijão caupi na presença de agentes iônicos (KCl e Na₂SO₄) e osmóticos (PEG 6000 e Manitol)

As plantas transplantadas foram crescidas durante sete dias em solução nutritiva, sendo que, no 3° dia, a solução foi renovada e modificada pela exclusão de NO₃⁻, objetivando o esgotamento do mesmo nas raízes. As plantas permaneceram com a nova solução durante quatro dias para um período de aclimação sem nitrato. Os sais Ca(NO₃)₂ e KNO₃ foram substituídos por CaCl₂ e K₂SO₄ no sentido de manter constante as concentrações de Ca⁺² e de K⁺ nas plantas supridas na ausência de nitrato.

Para o experimento de influxo em baixa afinidade, as raízes plantas de feijão caupi foram destacadas e lavadas em solução de CaCl₂ 0,1 mM à temperatura ambiente

por 30 min para a eliminação do excesso de NO_3^- retidas na parede celular. Em seguida, as raízes foram transferidas para frascos contendo 50 ml de meio de incubação MES 1mM, Tris 0,5 mM, CaCl_2 0,1 mM pH 6,0 o qual foi acrescido de concentrações crescentes de NO_3^- (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mM de KNO_3) e os respectivos tratamentos: controle; NaCl 100 mM; Na_2SO_4^- 100 mM; KCl 100 mM e Manitol 100 mM, com quatro repetições cada e incubadas em banho-maria a 30° C por um período de 60 min. Para o experimento em alta afinidade, modificou-se apenas as concentrações de NO_3^- para 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1mM de KNO_3 e os respectivos tratamentos: controle; NaCl 100 mM e Manitol 100 mM.

Após o período de incubação, as raízes foram removidas da solução de incubação e postas para secar em estufa a 65° C por 48 horas para posterior determinação da massa seca (MS). A verificação do influxo foi feita por eletrodo seletivo para NO_3^- modelo Seven multi da Mettler Toledo®. O influxo de NO_3^- foi determinado através da diferença entre a concentração inicial menos a concentração final de NO_3^- das soluções contidas nos frascos e os resultados foram anotados após prévia calibração do aparelho. O eletrodo foi configurado para expressar as leituras na forma direta de mmol.L^{-1} .

Os dados da cinética do influxo de nitrato foram expressos em $\mu\text{mol.de NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MS} \cdot \text{h}^{-1}$. O gráfico foi elaborado com o auxílio do programa Sigma-Plot®10, onde a regressão não-linear permitiu um ajuste à função do tipo hipérbole retangular.

4.5 – Determinações

4.5.1 – Concentração de nitrato pelo método do ultravioleta

Alíquotas de 50 μL do meio de incubação foram adicionadas com 450 μL de água deionizada e despejadas em tubos de ensaio contendo 2000 μL de ácido perclórico 5%. O método utilizado foi o de Cawse (1967), após a mistura da amostra + ácido perclórico, agitou-se vigorosamente com agitador tipo vortex. Após foram feitas as leituras em ultravioleta por espectrofotometria na faixa de 210 nM. O branco foi feito por água destilada deionizada (500 μL) + ácido perclórico 5% (2000 μL) em substituição ao extrato. A concentração de nitrato foi obtida a partir de uma curva

padrão com concentrações crescentes de NO_3^- (0,1, 2, 4, 6, 8 e 10 mmol^{-1}) diluída 10x. Os resultados foram expressos em μmol de $\text{NO}_3^- \text{mL}^{-1}$ de solução nutritiva.

4.5.2 – Concentração de nitrato através de eletrodo seletivo

Para a determinação da concentração de nitrato através do eletrodo seletivo de NO_3^- , utilizou-se o aparelho Seven multi, marca Mettler Toledo®. Dois eletrodos foram imersos na solução (50 mL) analisada, um indicador e outro de referência após prévia calibração do aparelho. O eletrodo foi configurado para expressar as leituras na forma direta de mmol.L^{-1} . Os resultados das leituras eram subtraídos das leituras obtidas durante a calibração do aparelho, obtendo desta forma, a concentração real da amostra analisada.

4.5.3 – Concentração de cloreto pelo método do eletrodo seletivo

Para a determinação da concentração de cloreto através do eletrodo seletivo de Cl^- , utilizou-se o aparelho Seven multi, marca Mettler Toledo®. Dois eletrodos foram imersos na solução (50 mL) analisada, um indicador e outro de referência após prévia calibração do aparelho. O eletrodo foi configurado para expressar as leituras na forma direta de mmol.L^{-1} . As leituras das amostras foram subtraídas das leituras das amostras padrões obtidas durante a calibração do aparelho, obtendo desta forma, a concentração real da amostra analisada.

4.5.4 – Ajuste das curvas de influxo pelo modelo de Michaelis-Menten

O ajuste das curvas de influxo de NO_3^- para o modelo de Michaelis-Menten foi possível através do software Sigma-Plot 10[®], permitindo a transformação para uma regressão não-linear, do tipo hipérbole retangular de dois parâmetros.

4.5.5 – Determinação dos parâmetros K_m e V_{max}

Para encontrar os valores das constantes cinéticas K_m e V_{max} , a equação de Michaelis-Menten foi transformada pelo método do duplo-recíproco. Os valores da cinética do influxo de NO_3^- foram invertidos, ou seja, $1/\text{Influxo}$ e $1/[\text{NO}_3^-]$. Após a inversão, os valores foram plotados graficamente numa regressão linear do tipo ($y = ax + b$), obtendo o valor de R^2 , que é conhecido como equação de Lineweaver-Burk. A partir da equação gerada da regressão estimaram-se os valores de K_m e V_{max} substituindo os valores na equação de Michaelis-Menten. Abaixo se encontra o processo de inversão da equação de Michaelis-Menten para equação lineweaver-Burk:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \longrightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

A transformação permitiu ajustar a equação linear da reta para a seguinte forma: $V_{max} = 1/b$ e $K_m = a \cdot V_{max}$, respectivamente. A partir destas transformações, calcularam-se as constantes cinéticas aparentes para cada inibidor utilizado.

4.5.6 – Determinação da osmolaridade dos agentes

A osmolaridade dos agentes iônicos e osmóticos foi determinada com o auxílio do osmômetro previamente calibrado, modelo VAPRO, marca Wescor.

4.6 – Análises estatísticas

Os dados dos experimentos descritos anteriormente foram analisados a partir de ajuste por regressão linear, polinomial do 2º grau ou hipérbole retangular, acrescidos dos respectivos desvios padrões das médias. Quando necessário uma análise de variância (ANOVA) com desdobramento para cada tratamento foi realizada. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Ambos foram realizados com o auxílio do programa Sisvar (Versão 5.0; UFLA-DEX).

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Experimento 1: Cinética de influxo líquido de NO_3^- e acumulação de Cl^- em raízes destacadas de feijão caupi expostas a diferentes concentrações de NaCl

Com o intuito de verificar as relações existentes entre influxo NO_3^- através do sistema de baixa afinidade, diferentes concentrações externas de NO_3^- e acumulação de cloreto, realizou-se o experimento cujos resultados estão apresentados através da Figura 1. Os resultados demonstram claramente que existe, até certo limite (concentração de NaCl igual 80 mM), uma relação inversa entre o influxo líquido de nitrato e a absorção de cloreto. Mostra também que o decréscimo no influxo de nitrato é aproximadamente linear com o aumento das concentrações externas do NaCl enquanto que a acumulação de cloreto tende a seguir o modelo de uma hipérbole retangular (cinética de Michaelis-Menten).

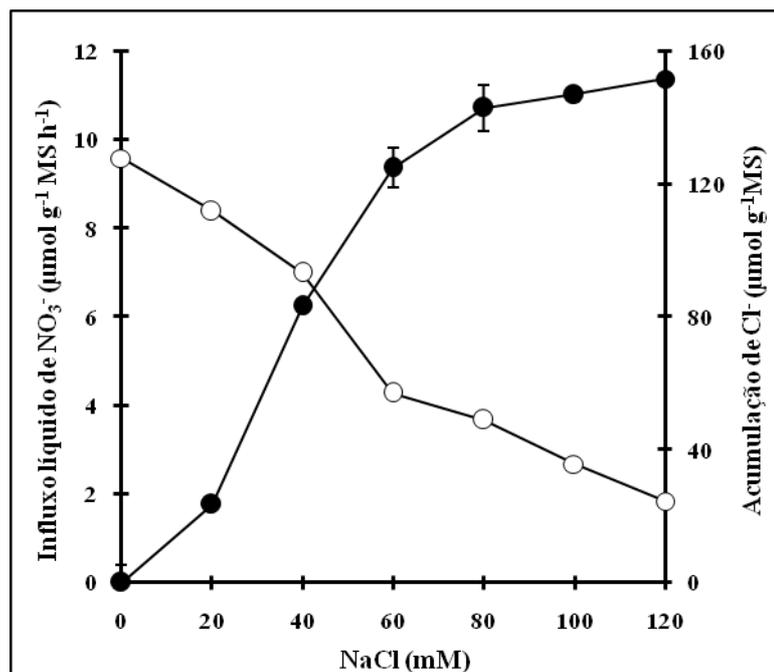


Figura 1- Cinética de influxo líquido de NO_3^- (\circ) e acumulação de Cl^- (\bullet) em raízes destacadas de feijão caupi, em resposta ao aumento da concentração de NaCl. Os pontos e as barras representam as médias e desvio padrão de quatro repetições, respectivamente.

Os resultados deste experimento indicaram que o NaCl afetou intensamente o influxo de NO_3^- em raízes de caupi. Cerezo et al. (1999) afirmaram que este efeito deletério da salinidade sobre a absorção de NO_3^- pode estar mais relacionado à competição direta do íon Cl^- pelos sítios transportadores de NO_3^- do que com a redução da taxa de transpiração. Trabalhos conduzidos pelo mesmo grupo, trabalhando com absorção de NO_3^- , também tiveram respostas semelhantes quando trataram plantas de feijão caupi com 100 mM de NaCl (Silveira et al., 2001, Silveira et al., 1999). Em raízes de cajueiros jovens, observou-se um aumento da acumulação de Cl^- à medida que se aumentou as concentrações de NaCl até por volta de 100 mM na solução nutritiva (Morais et al., 2007). Em raízes de tomate observou-se o mesmo aumento da acumulação de Cl^- até 100 mM de NaCl e a diminuição da concentração de NO_3^- na raiz, sendo a redução do influxo de NO_3^- uma das causas desta mudança (Debouba et al., 2006).

5.2 – Experimento 2: Influxo e efluxo acumulado de NO_3^- em raízes destacadas de plantas de feijão caupi previamente tratadas ou não com 50 e 100 mM de NaCl

Neste experimento verifica-se que houve uma redução do influxo acumulado de NO_3^- em ambos os sistemas de plantas cultivadas; não tratadas (Figura 2A) e previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva (Figura 2B). De acordo com figura 2 percebe-se que o aumento da absorção acumulada de NO_3^- se deu até 60 minutos de exposição em meio de incubação. Após este período, o influxo teve uma perda de sua atividade e este comportamento foi observado em todos os tratamentos aplicados. A presença de 50 e 100mM de NaCl em raízes não tratadas diminuiu significativamente a absorção acumulada de NO_3^- em 32% e 53% respectivamente. Em raízes de plantas pré-tratadas, essa redução foi de 14% e 44 % respectivamente (Tabela 2). As análises apresentaram um coeficiente de variação de aproximadamente 9,5% para plantas não tratadas e pré-tratadas, respectivamente.

Em paralelo, as análises de influxo acumulado no tempo permitiram a caracterização da taxa de influxo de NO_3^- de baixa afinidade de raízes destacadas de feijão caupi. A análise dos pontos pela figura 3 permitiu observar uma redução significativa da taxa de influxo nos dois tratamentos de NaCl aplicados em meio de incubação. Essa diferença foi também observada em ambos os sistemas de plantas cultivadas (não tratadas e previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva). De acordo com a figura 3, foi possível verificar um decréscimo da taxa de influxo em função do tempo de exposição, sendo que o tratamento com raízes de plantas não tratadas com 50 e 100 mM de NaCl, apresentou maior redução da taxa de influxo de NO_3^- (Tabela 3).

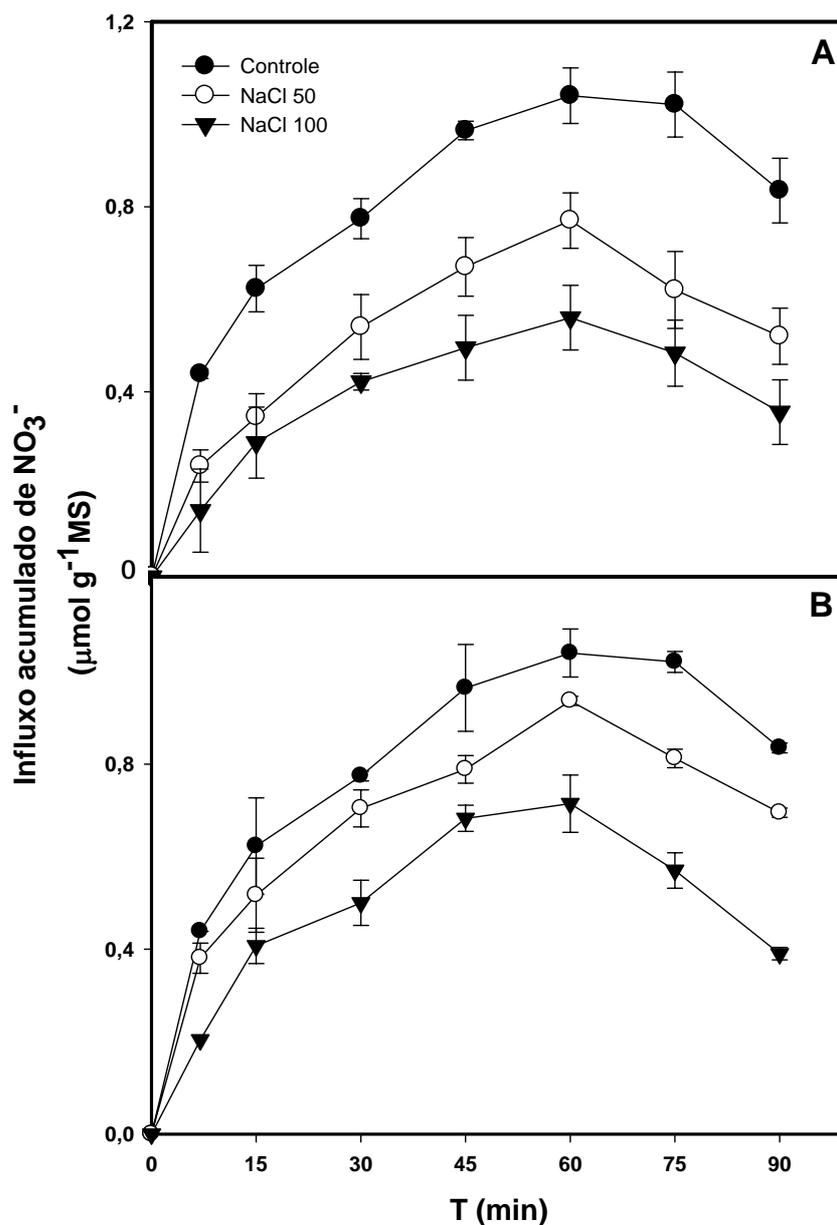


Figura 2: Efeito do tempo de exposição ao NaCl sobre o influxo acumulado de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi. A figura A representa raízes de plantas não tratadas e B raízes de plantas previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva na ausência, 50 e 100 mM de NaCl. Os pontos e as barras representam as médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente.

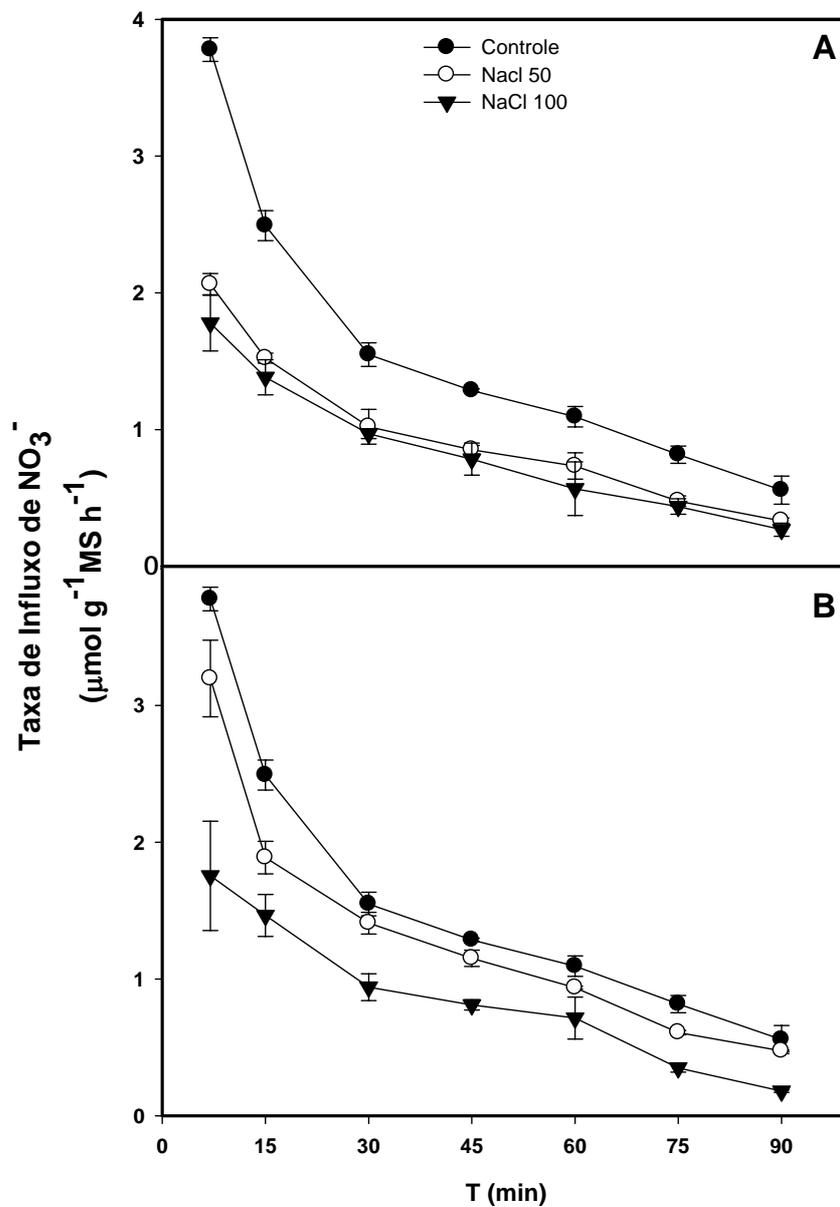


Figura 3: Efeito do tempo de exposição ao NaCl sobre a taxa de influxo de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi. A figura A representa raízes de plantas não tratadas e B raízes de plantas previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva na ausência, 50 e 100 mM de NaCl. Os pontos e as barras representam as médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente.

Os resultados sobre o influxo acumulado de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi (Figura 2) confirmaram o efeito deletério do estresse salino provocado por NaCl 50 e 100 mM. Este efeito foi mais expressivo com plantas não tratadas (figura 2A), onde se observou maior redução na absorção de NO_3^- em comparação com plantas pré-tratadas (figura 2B), indicando que as plantas pré-tratadas de feijão possam ter adquirido uma possível aclimatação durante os dois dias de exposição ao NaCl (Figura 4). Alguns estudos já indicaram que os processos de aquisição de N e crescimento de plantas caupi expostas a meio salino resultam em uma homeostase para a aquisição do NO_3^- (Niu, 1995). Silveira et al. (2001), observaram que quando plantas de feijão caupi foram pré-aclimatadas com 50 mM de NaCl, ocorreu uma homeostase entre a aquisição de N e crescimento sob exposição ao NaCl.

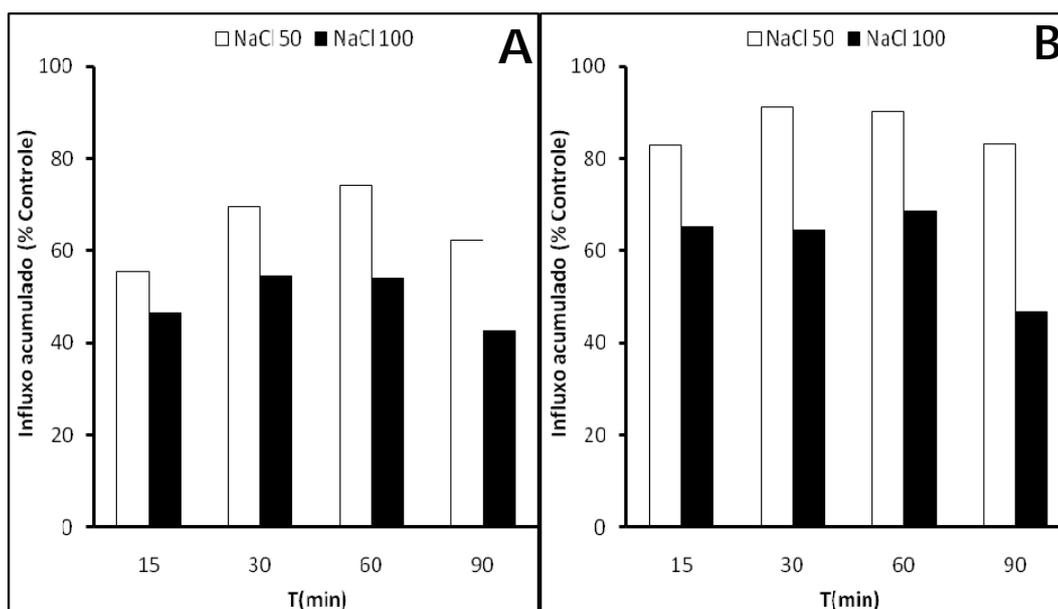


Figura 4: Influxo acumulado relativo (% do controle) de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi. A figura A representa raízes de plantas não tratadas e B raízes de plantas previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva com 50 e 100 mM de NaCl.

A redução da taxa de influxo de NO_3^- (Figura 3) é observada com o aumento do tempo de exposição ao meio de incubação. Durante os primeiros quinze minutos observa-se uma taxa muito elevada, indicando que as raízes absorvem maior parte do NO_3^- durante os primeiros minutos de exposição ao nitrato em meio de incubação. Em raízes de plantas pré-tratadas os dados da taxa de influxo de NO_3^- assemelham-se aos de Silveira et al. (2001), onde o pré-tratamento com 50 mM de NaCl apresentou uma relação muito aproximada com o controle.

No experimento de efluxo acumulado de NO_3^- com raízes destacadas de feijão caupi detectou-se um aumento significativo nos três tratamentos aplicados em meio de incubação. Essa diferença foi também observada em ambos os sistemas de plantas cultivadas; não tratadas (Figura 5A) e previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva (Figura 5B). De acordo com a figura 5, verificou-se o aumento do efluxo de NO_3^- até um período de 80 minutos de exposição em meio de incubação. Após este período, o efluxo apresentou uma perda de sua atividade e este comportamento foi observado em todos os tratamentos aplicados. Os tratamentos salinos (50 e 100 mM de NaCl) aplicados em raízes de plantas não tratadas causaram um aumento no efluxo de NO_3^- em 23 e 57% respectivamente. Em raízes de plantas pré-tratadas, esse aumento foi de 57 e 97 %, respectivamente (Tabela 4).

Em paralelo, as análises do efluxo acumulado de NO_3^- permitiram a caracterização da taxa de efluxo de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi. Na figura 6, observa-se uma redução significativa nos três tratamentos aplicados em meio de incubação. Essa diferença também é observada em ambos os sistemas de plantas cultivadas; não tratadas (Figura 6A) e previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva (Figura 6B). Os gráficos analisados mostram uma diminuição da taxa de efluxo de NO_3^- com o aumento do tempo de incubação até por volta de 80 minutos. Após esse período, houve uma tendência à estabilização do efluxo em plantas não tratadas e pré-tratadas (Tabela 5). Estes dados indicam que a eficiência máxima do processo de efluxo de NO_3^- em raízes de feijão ocorreu até por volta de 80 minutos em exposição ao meio de incubação. Dentro do mesmo contexto, verificou-se que em raízes pré-tratadas com 50 e 100 mM de NaCl há uma taxa de efluxo muito mais eficiente do que com plantas não tratadas (Figura 6). A figura 7 ilustra as mudanças relativas do efeito do NaCl em raízes tratadas e pré-tratadas sobre o efluxo acumulado de NO_3^- .

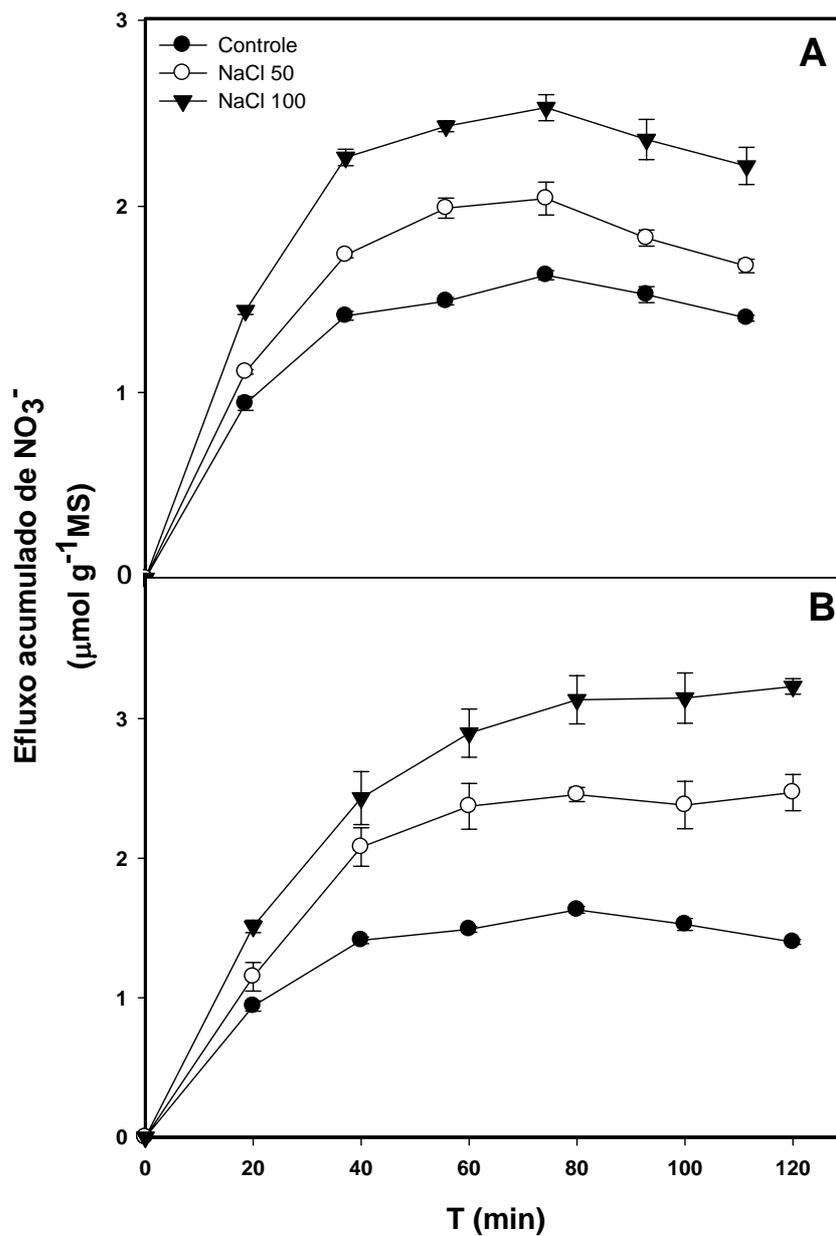


Figura 5: Efeito do tempo de exposição ao NaCl sobre o efluxo acumulado de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi. A figura A representa raízes de plantas não tratadas e B raízes de plantas previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva na ausência, 50 e 100 mM de NaCl. Os pontos e as barras representam as médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente.

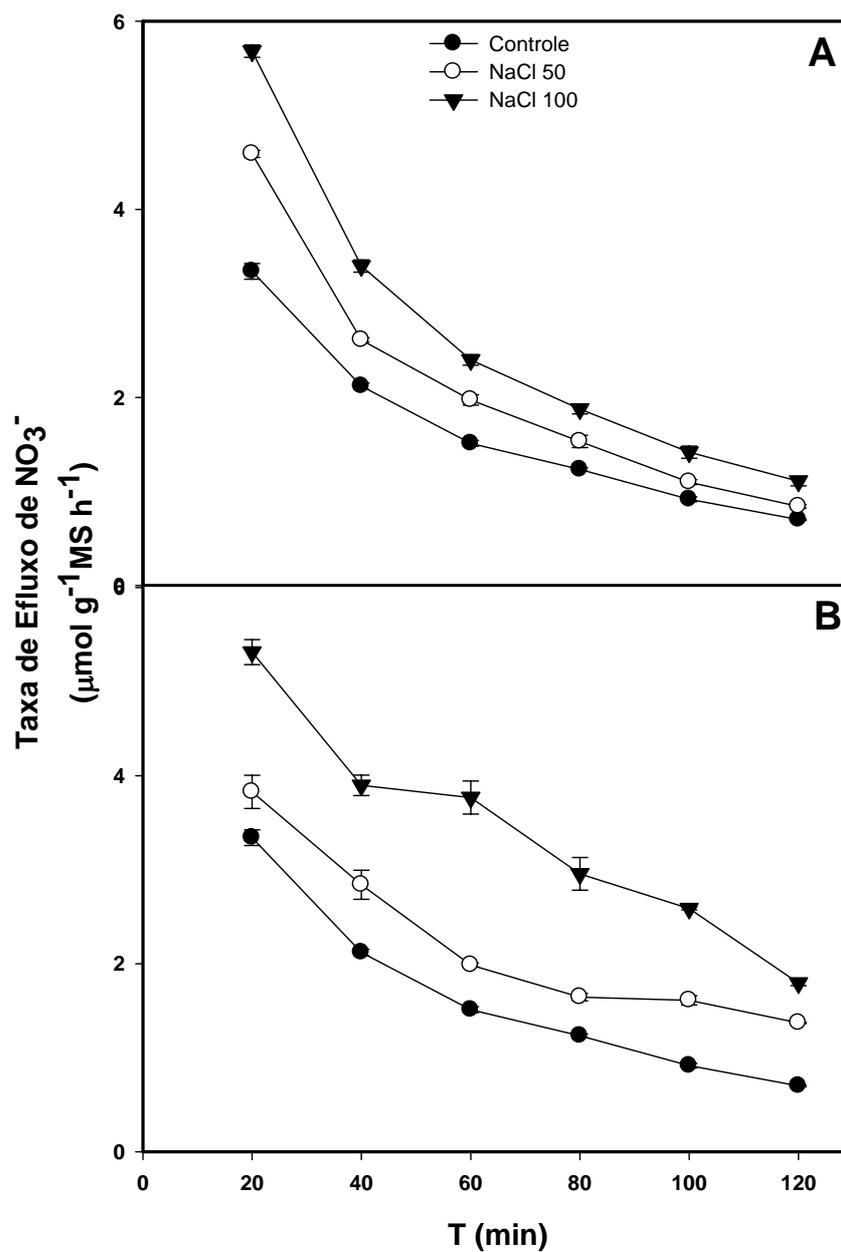


Figura 6: Efeito do tempo de exposição ao NaCl sobre a taxa de efluxo de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi. A figura A representa raízes de plantas não tratadas e B raízes de plantas previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva na ausência, 50 e 100 mM de NaCl. Os pontos e as barras representam as médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente.

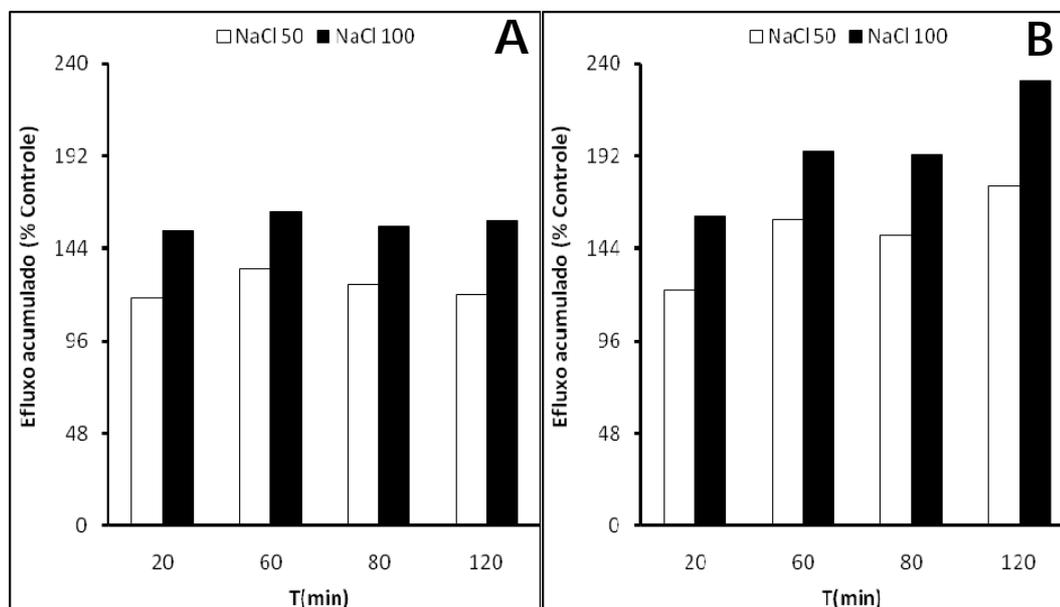


Figura 7: Efluxo acumulado relativo (% do controle) de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi. A figura A representa raízes de plantas não tratadas e B raízes de plantas previamente tratadas durante 48 horas em solução nutritiva na ausência, 50 e 100 mM de NaCl.

Os efeitos da salinidade sobre o efluxo acumulado de NO_3^- indicaram que o NaCl é um agente estimulador do efluxo de NO_3^- , sendo mais expressivo quando em altas concentrações (Figura 5). O efeito mais expressivo ocorreu em plantas com raízes pré-tratadas durante dois dias com NaCl a 50 e 100 mM (Figura 7). Tal comportamento pode ser atribuído pelo fato de que plantas de feijão caupi com raízes pré-tratadas com NaCl tenham aumentado a concentração interna de NO_3^- através da aclimação adquirida com o tratamento (Silveira et al., 2001). Em paralelo, o aumento da concentração de NO_3^- feita pela aplicação de 10 mM de NO_3^- em solução nutritiva no período que antecedia 24 horas das determinações, pode ter influenciado a relação influxo/efluxo, aumentando também o efluxo de NO_3^- para o meio externo (Britto & Kronzucker, 2006). A redução da taxa de efluxo de NO_3^- (Figura 6) em função do tempo de exposição ao meio de incubação, retratou que durante os primeiros vinte minutos há um efluxo de NO_3^- muito elevado, indicando que as raízes exsudam a maior parte do NO_3^- durante os primeiros minutos de exposição ao meio

5.3 – Experimento 3: Caracterização da cinética de efluxo de nitrato na presença de NaCl e de agentes osmóticos (PEG 6000 e Manitol)

No experimento com agentes iônicos e osmóticos para verificar o tipo de estimulação ocorrida no efluxo de NO_3^- com raízes de feijão-caupi, observou-se que os tratamentos isosmóticos NaCl 50 mM, PEG 12% ($\Psi_{os} = - 0,23$ MPa) e NaCl 100 mM resultaram em aumento do efluxo de NO_3^- para o meio externo em 15, 35 e 40 %, respectivamente (Figura 8). Entretanto, o tratamento com o agente osmótico manitol 100 mM ($\Psi_{os} = - 0,23$ MPa) promoveu um efeito inesperado, reduzindo o efluxo de NO_3^- em 41% em relação ao controle (Figura 8A). Os resultados mostraram que os agentes NaCl e PEG foram estimuladores do efluxo de NO_3^- e isto denota que o processo de efluxo de NO_3^- foi estimulado também por agentes osmóticos, podendo-se deduzir que a componente osmótica foi mais limitante em concentrações isosmóticas. Em geral, os resultados indicaram que o aumento efluxo de NO_3^- pela salinidade não é um processo exclusivo da competição com o cloreto, mas também por efeitos osmóticos, sendo a atividade máxima da taxa de efluxo nos primeiro minutos de incubação (Figura 9). O comportamento inferido pelo NaCl pode estar associado a mudanças que o Cl^- provoca ao nível de citosol, causando o efluxo de NO_3^- do vacúolo para citosol e do citosol para o meio externo e isto pode aumentar o efeito competitivo entre Cl^- e NO_3^- pelos sítios transportadores de NO_3^- o que confere com os dados de alguns autores (Niu et al., 1995; Cerezo et al., 1999). Em relação ao tratamento com manitol, observou-se um efeito isolado deste sal, sugerindo que os mecanismos do manitol atuam no potencial de membranas das células, sendo mais específico, na extrusão de H^+ e ativação de H^+ -ATPases, inibindo o efluxo de NO_3^- (Zingarelli et al., 1999).

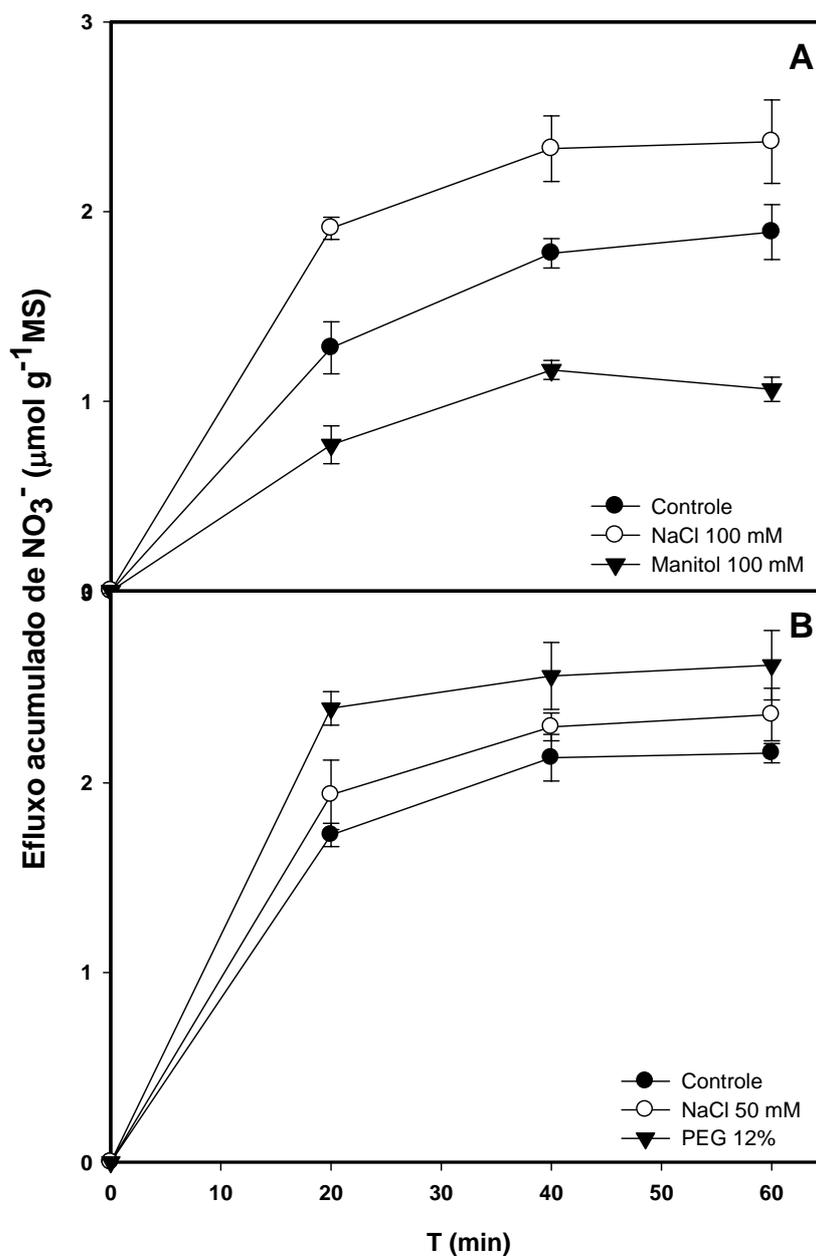


Figura 8: Efeito de agentes iônicos (NaCl) e de agentes osmóticos (manitol e PEG) em diferentes concentrações e diferentes potenciais osmóticos sobre o efluxo de NO_3^- em raízes de feijão caupi. A figura A representa raízes tratadas com agentes isomolares :NaCl e Manitol 100 mM e (B) raízes tratadas com agentes isosmóticos NaCl: 50 mM e PEG 12% (m/v) ($\psi_{os} = -0,23$ MPa). Os pontos e as barras representam as médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente.

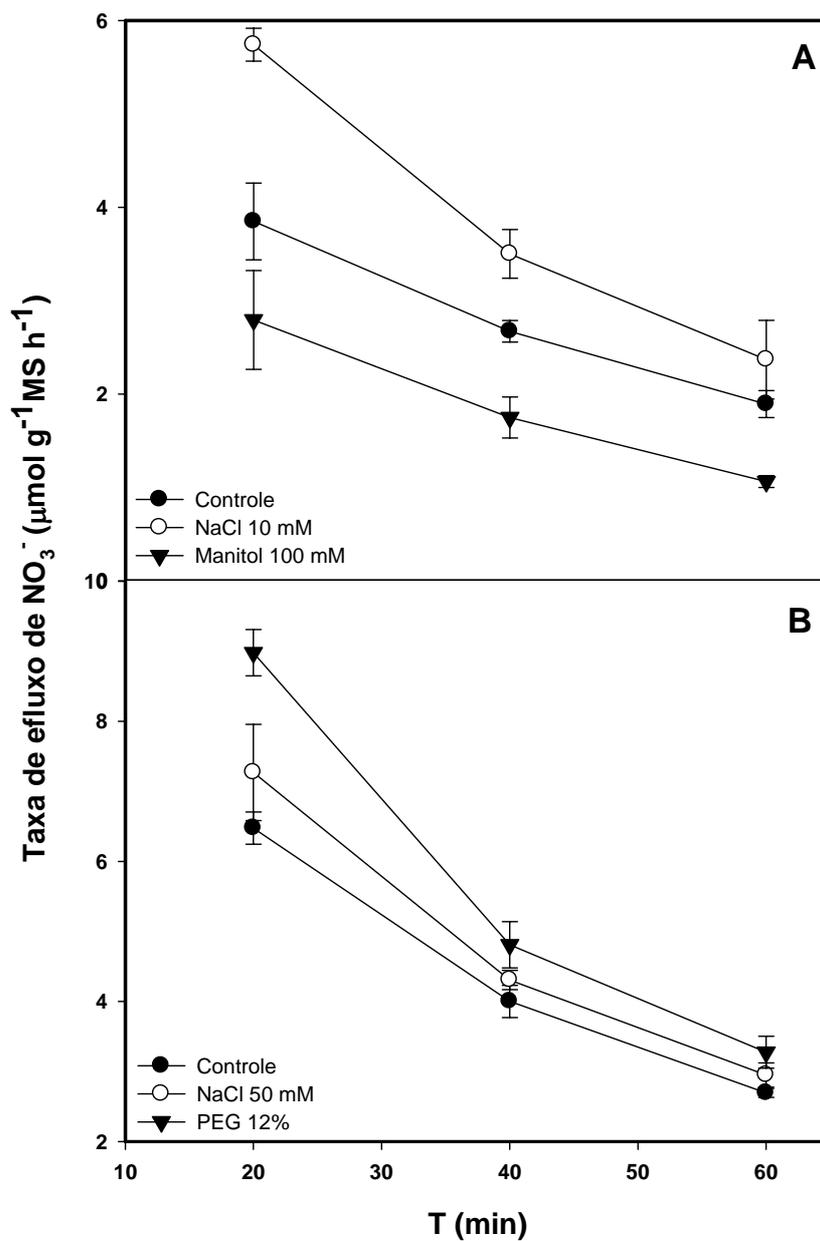


Figura 9: Efeito de agentes iônicos (NaCl) e de agentes osmóticos (manitol e PEG) em diferentes concentrações e diferentes potenciais osmóticos sobre a taxa de efluxo de NO_3^- em raízes de feijão caupi. A figura A representa raízes tratadas com agentes isomolares de NaCl e Manitol 100 mM e (B) raízes tratadas com agentes isosmóticas NaCl 50 mM e PEG 12% (m/v) ($\psi_{os} = -0,221$ MPa). Os pontos e as barras representam as médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente.

5.4 – Experimento 4: Cinética do influxo de NO_3^- em dois sistemas de absorção (baixa e alta afinidade) em raízes destacadas de feijão caupi na presença de NaCl

Neste experimento de cinética de influxo de NO_3^- em sistema de baixa e alta afinidade (LATS e HATS, respectivamente) com raízes destacadas de feijão caupi, verificou-se que os modelos das curvas caracterizaram os princípios gerais da cinética de Michaelis-Menten (Figura 10). Neste experimento, a análise dos resultados por regressão não-linear possibilitou o ajuste dos valores obtido à função hipérbole retangular, característica da equação de Michaelis-Menten. Nos sistemas LATS e HATS o ajuste da curva para hipérbole retangular permitiu obter um $R^2 = 0,99$ em ambos os tratamentos controle e NaCl 100 mM. Os coeficientes de variação foram de 10,5% e 7% para LATS e HATS, respectivamente.

A exposição à concentração de NaCl 100 mM provocou uma redução significativa do influxo de NO_3^- em raízes destacadas crescidas sob os dois sistemas de absorção de NO_3^- . Essa redução foi de aproximadamente 60% e 45% para os sistemas de baixa e alta afinidade, respectivamente (Tabela 6). Os valores obtidos para as constantes cinéticas V_{\max} e K_m de para cada tratamento foram calculadas a partir de uma transformação algébrica onde os dados da curva cinética foram invertidos em ambos os lados da equação de Michaelis-Menten, resultando em uma equação linear denominada equação de *lineweaver-Burk* (Figura 11). As transformações dos dados em LATS possibilitou estimar os valores de V_{\max} e K_m para $13,3 \mu\text{mol g}^{-1}\text{Ms h}^{-1}$ e 4,4 mM (controle) e $4,3 \mu\text{mol g}^{-1}\text{Ms h}^{-1}$ 1,4 mM (NaCl 100 mM). Para HATS, os valores estimados foram $4,74$ e $3,92 \mu\text{mol g}^{-1}\text{Ms h}^{-1}$ para V_{\max} e $0,47$ e $0,95$ mM para K_m , nos tratamentos controle e NaCl 100 mM, respectivamente (Figura 10). De acordo com a figura 11, observou-se que as interseções dos tratamentos cruzaram-se em pontos equivalentes para LATS e HATS, respectivamente. Através das retas verificaram-se as interseções ocorreram próximas ao eixo X e isto confirma a ocorrência de uma inibição do tipo mista (não- competitiva).

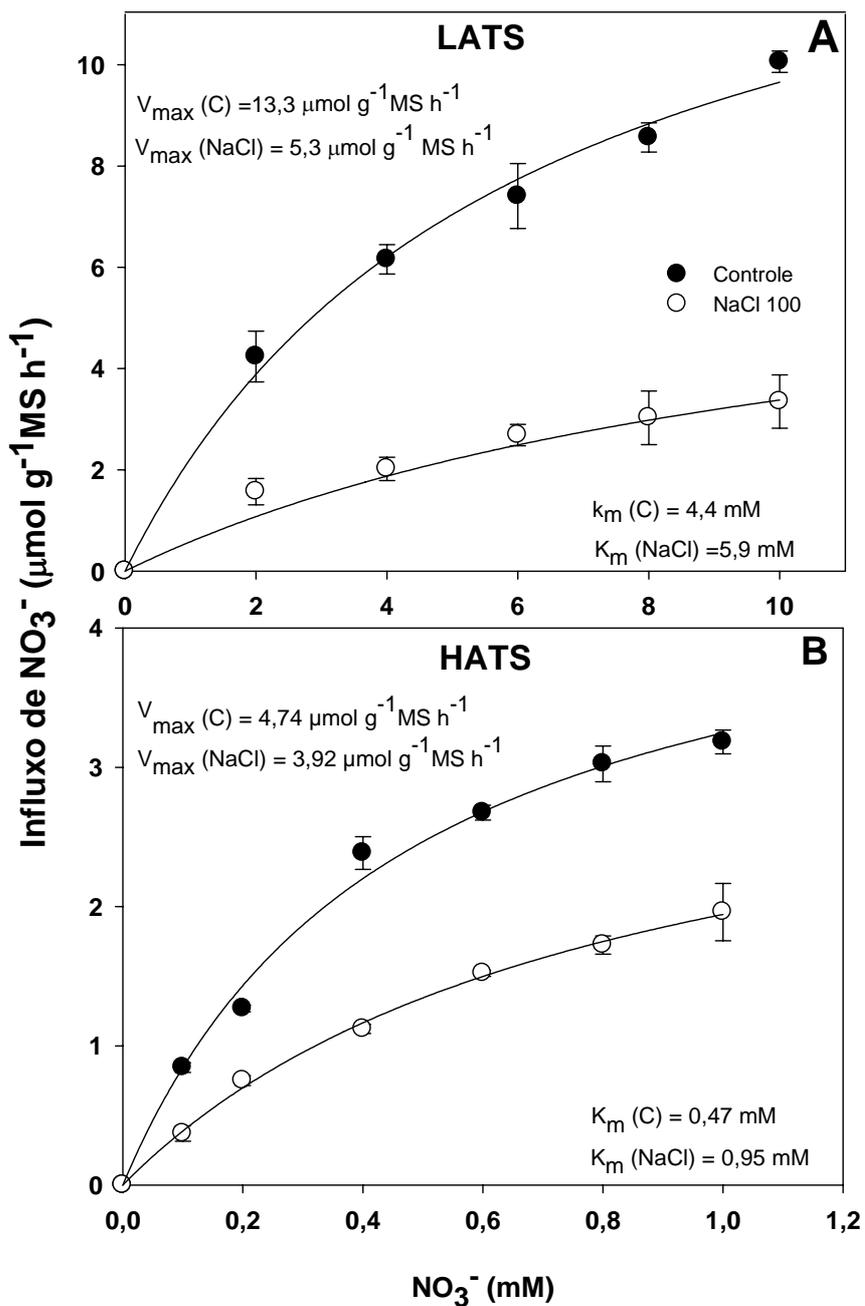


Figura 10: Cinética de Influxo de nitrato em sistemas de absorção de baixa afinidade (A) e alta afinidade (B) de raízes destacadas de feijão caupi, em resposta a duas concentrações de NaCl (0 e 100 mM). Os pontos e as barras representam médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente. As constantes cinéticas V_{\max} e K_m para controle e NaCl 100 mM estão representadas por (C) e (NaCl), respectivamente.

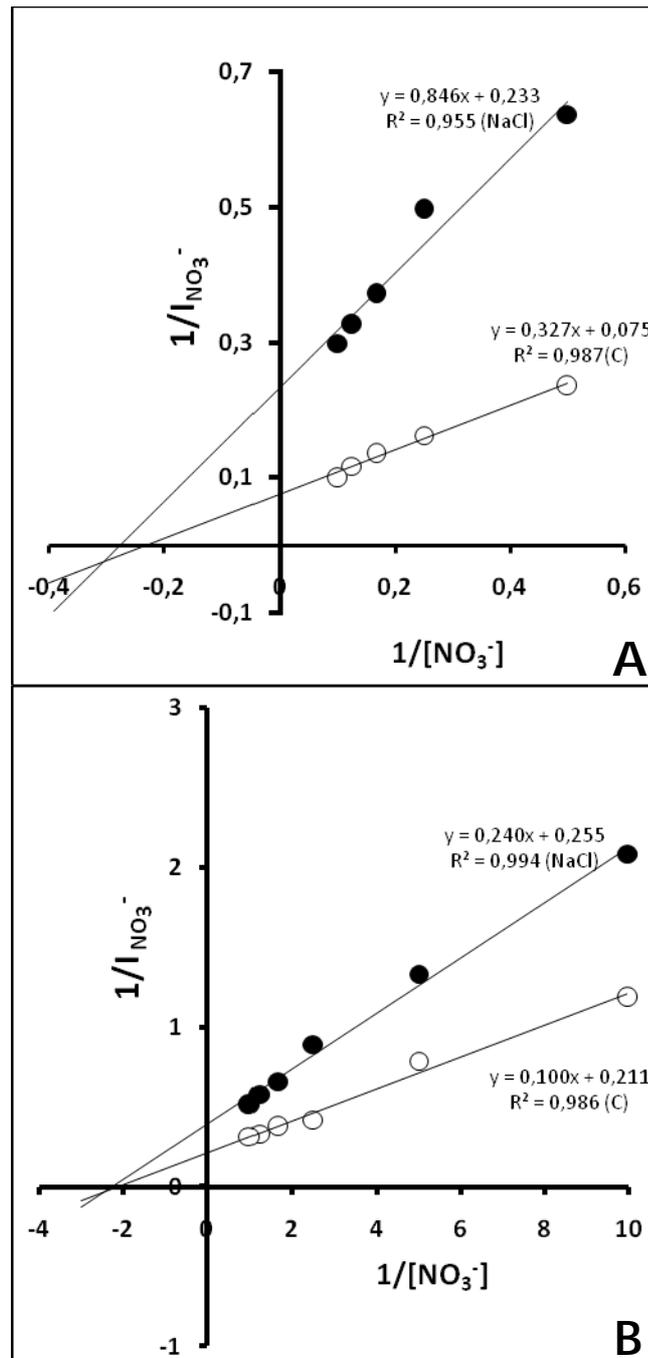


Figura 11: Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) mostrando o tipo de inibição do NaCl na cinética de influxo de NO_3^- nos dois sistemas de baixa (A) e alta (B) afinidade. As retas foram obtidas a partir dos dados originais de influxo e concentrações de nitrato. As constantes V_{max} e K_m foram calculadas a partir das equações lineares.

Os resultados das curvas cinéticas permitiram verificar uma redução do V_{\max} e aumento de k_m nos dois sistemas de absorção na presença de NaCl 100 mM, indicando uma possível inibição mista com características de não-competitiva para os sistemas de baixa e alta afinidade. Lehninger (1976), afirmou que em inibições do tipo não competitivas, os valores V_{\max} são reduzidos e, conseqüentemente, não interfere com a velocidade de desdobramento do complexo substrato/enzima. Através dos dados de K_m , percebe-se que em solos salinos, o aumento de K_m é um comportamento esperado, pois as concentrações de NaCl são bastante elevadas e o feijão caupi, também é uma cultura que habita solos salinizados (Ehlers e Hall, 1997). Pelos dados das constantes cinéticas obtidas para LATS e HATS, verifica-se que as análises são comparáveis com os dados de Aslam et al. (1992), relatando que em sistemas de transporte de baixa afinidade constitutivos, o K_m apresenta valores $> 0,5$ mM, e para sistemas de alta afinidade, o K_m apresenta valores $> 0,005$ mM.

5.5 – Experimento 5: : Cinética do influxo de NO_3^- para dois sistemas de absorção (alta e baixa afinidade) em raízes destacadas de feijão caupi na presença de agentes iônicos (NaCl, KCl e Na_2SO_4) e osmóticos (PEG 6000 e Manitol)

As análises dos dois tipos de agentes inibidores utilizados, iônicos (NaCl 100 mM, KCl 100 mM e Na_2SO_4 100 mM) e osmótico (manitol 100 mM e PEG 6000 17,84%), demonstraram que todos provocaram redução significativa do influxo de NO_3^- em relação ao controle (Figuras 12 e 13). Entre os agentes iônicos observou-se que o KCl 100 mM foi o agente que mais reduziu o influxo de NO_3^- seguido de NaCl e Na_2SO_4 (Figura 12). Porém, os agentes osmóticos manitol e PEG apresentaram as maiores reduções do influxo de NO_3^- quando comparados com o controle (Figura 13). Os agentes manitol e PEG reduziram o influxo de NO_3^- em raízes de feijão caupi em 66% e 60%, respectivamente. Os agentes iônicos NaCl, KCl e Na_2SO_4 reduziram o influxo de NO_3^- em 43,9%, 54,51% e 31,78%, respectivamente (Tabela 8). Em paralelo, verifica-se que o efeito inibitório do KCl teve uma redução comparada com os agentes osmóticos, em virtude de não diferir significativamente podendo-se indicar que a redução do influxo não é unicamente devido aos componentes osmóticos, mas também por competição iônica com o Cl^- . Os valores dos potenciais osmóticos de cada agente calculado por osmômetro indicaram que mesmo com diferentes potenciais, os agentes

manitol e PEG apresentaram resposta muito semelhante na inibição do influxo de NO_3^- (Figura 13). De acordo com as equações dos gráficos duplo-recíprocos na figura 14, os Agentes NaCl e Na_2SO_4^- apresentaram interseções próximas ao eixo X, em torno de 0,3 mM ($1/[\text{NO}_3^-]$) de NO_3^- (Figuras 14A e B). O KCl não apresentou interseção entre as retas plotadas (Figura 14C) e os agentes osmóticos apresentaram interseções muito aproximadas do eixo Y (Figura 15). Assim, as análises das figuras 14 e 15 permitiram caracterizar as inibições do tipo não-competitiva para os agentes NaCl e Na_2SO_4 e competitiva para manitol e PEG, respectivamente. O KCl apresentou uma resposta aproximada da inibição incompetitiva devido a inclinação equivalentes das duas retas. A inibição incompetitiva é reconhecida mais facilmente em concentrações fixas do inibidor, e a característica que demonstra esse efeito é a inclinação constante das retas e diminuição de V_{max} na presença do inibidor (Lehninger, 1976).

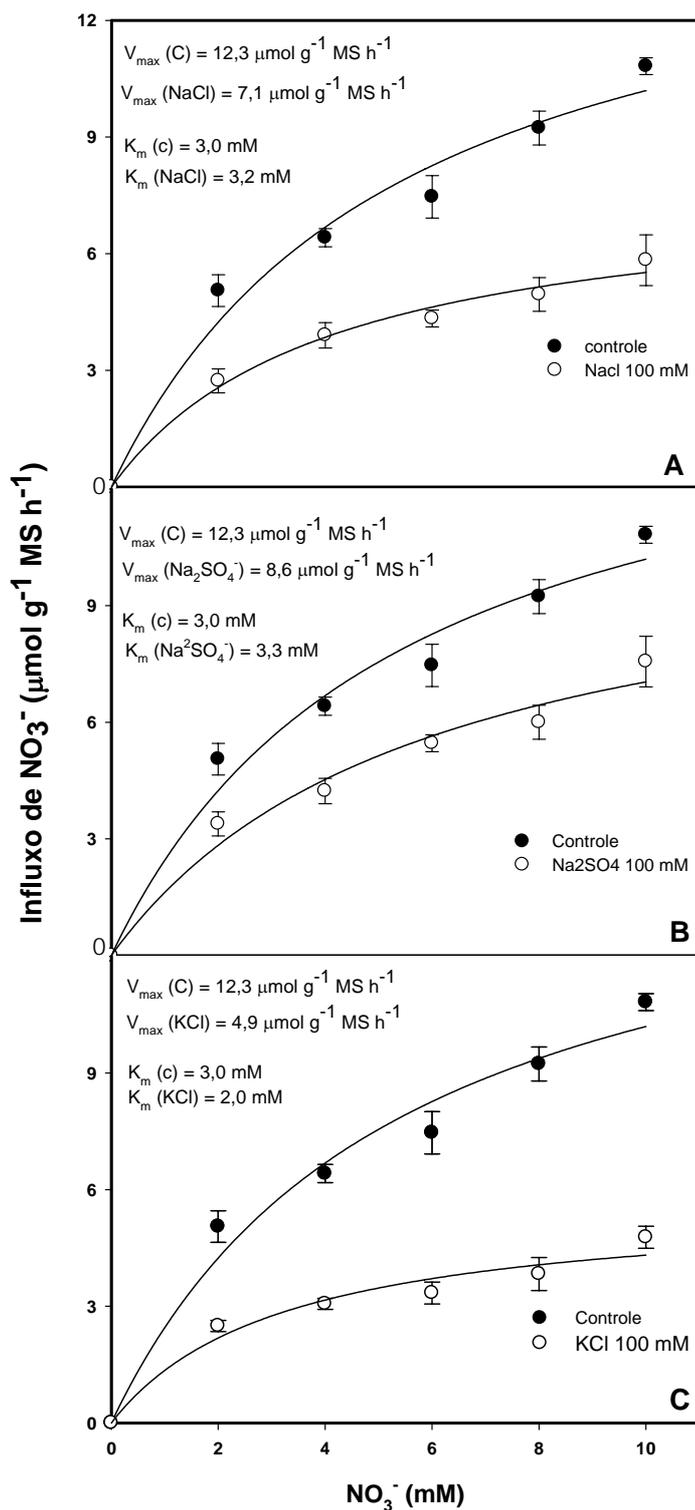


Figura 12: Efeito de diferentes inibidores sobre a cinética do Influxo de nitrato em sistema de baixa afinidade de raízes destacadas de feijão caupi. Controle x NaCl 100 mM (A), controle x Na_2SO_4^- 100 mM (B) e controle x KCl 100 mM (C). Os pontos e as barras representam as médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente. As constantes cinéticas $V_{m\acute{a}x}$ e K_m estão representadas por: controle (c), NaCl (NaCl), Na_2SO_4^- (Na_2SO_4) e KCl (KCl), respectivamente.

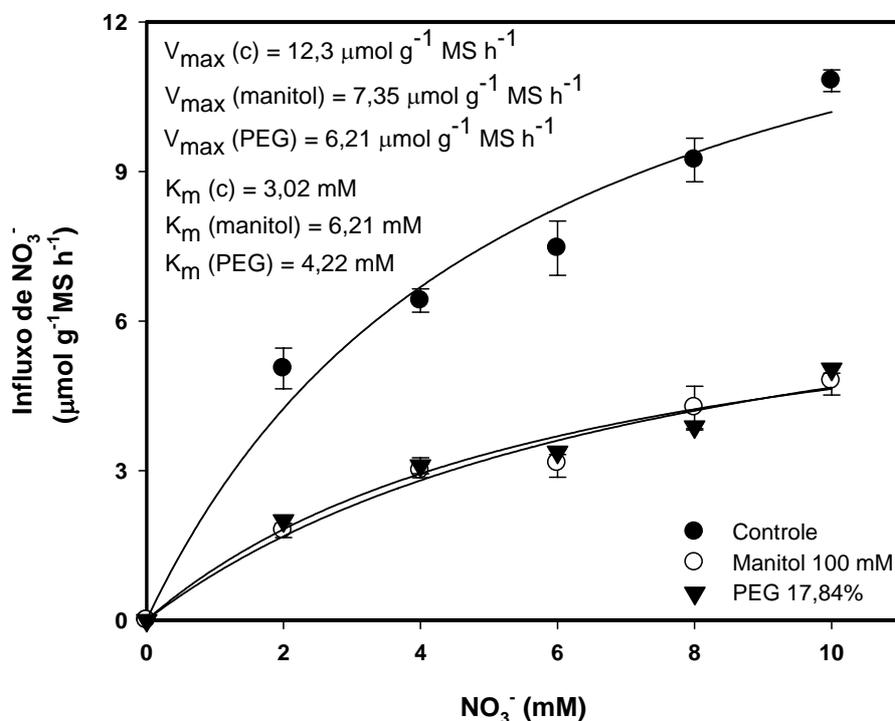


Figura 13: Efeito de dois inibidores osmóticos em diferentes potenciais osmóticos (PEG =17,84% = $\Psi_{os} = -0,43$ MPa e manitol 100 mM = $\Psi_{os} = -0,23$ MPa) sobre a cinética de Influxo de nitrato em sistema de absorção de baixa afinidade de raízes destacadas de feijão caupi. Os pontos e as barras representam médias e desvios padrões de quatro repetições, respectivamente. As constantes cinéticas $V_{m\acute{a}x}$ e K_m estão representadas por: controle (c), manitol (manitol) e PEG (PEG), respectivamente.

Nos valores obtidos de V_{max} e K_m na figura 12, observa-se uma tendência de inibição não-competitiva em relação aos agentes NaCl e Na_2SO_4^- devido a queda de V_{max} . O KCl também diminuiu o V_{max} , mas a inclinação das retas não foram alteradas com o aumento da concentração de NO_3^- . Os agentes osmóticos manitol e PEG aumentaram expressivamente os valores de K_m (Figura 13), indicando uma possível inibição competitiva pelos inibidores. Os dados para NaCl, assemelha-se com os experimentos de Peuke & Jeschke (1999), que através da equação de Lineweaver – Burk, confirmaram os decréscimos de V_{max} na cinética de influxo de NO_3^- em baixa afinidade na presença de NaCl, resultando em uma inibição do tipo não-competitiva.

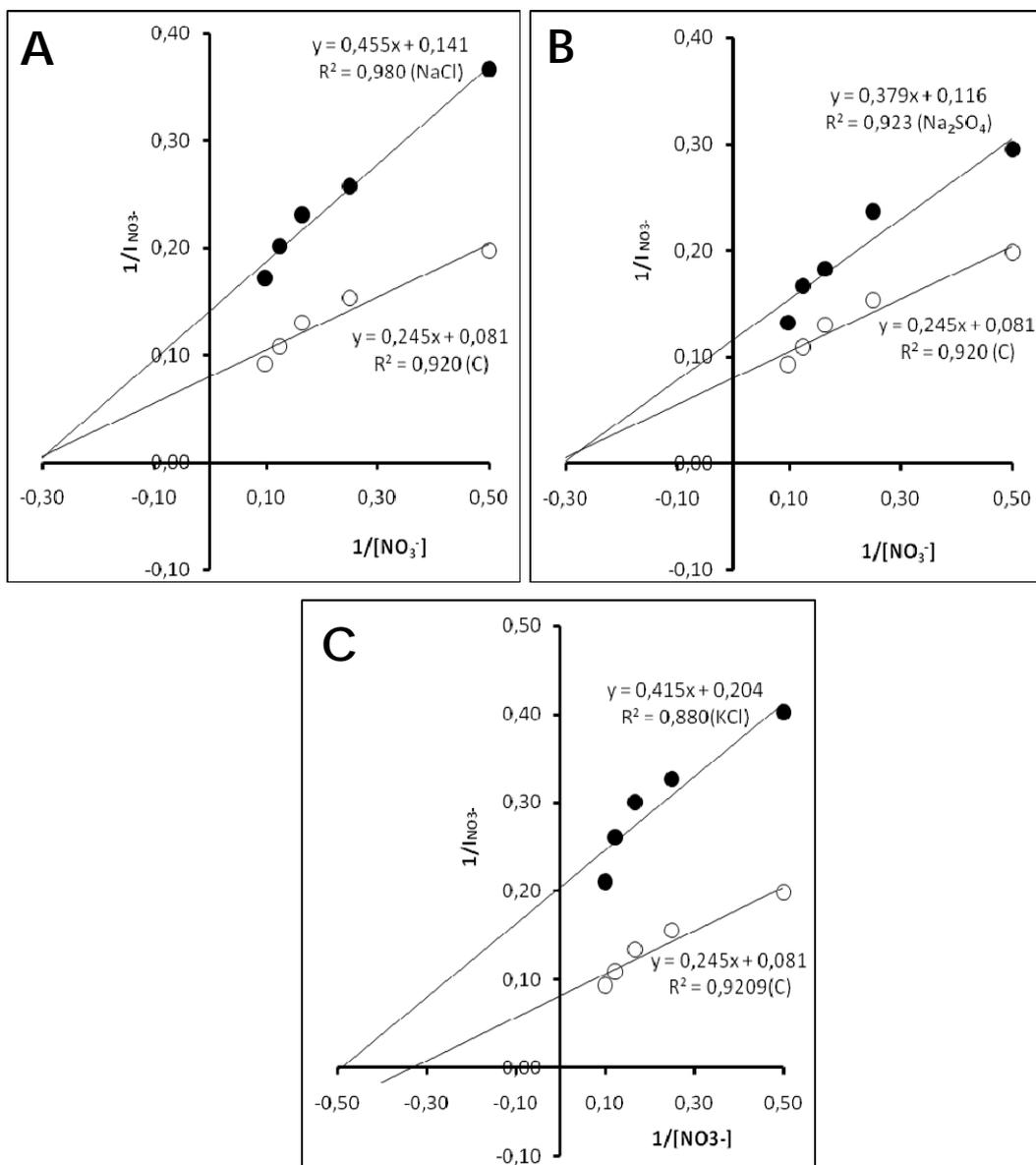


Figura 14: Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver- Burk) mostrando o tipo de inibição de diferentes agentes iônicos: NaCl 100 mM(A), Na_2SO_4^- 100 mM(B) e KCl 100 mM(C) na cinética de influxo de NO_3^- em sistema de baixa afinidade. As retas foram obtidas a partir dos dados originais de influxo e concentrações de nitrato. As constantes V_{\max} e K_m foram calculadas a partir das equações lineares. Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) mostrando o efeito da inibição de diferentes agentes iônicos: NaCl 100 mM(A), Na_2SO_4^- 100 mM(B) e KCl 100 mM(C) na cinética de influxo de NO_3^- em sistema de baixa afinidade.

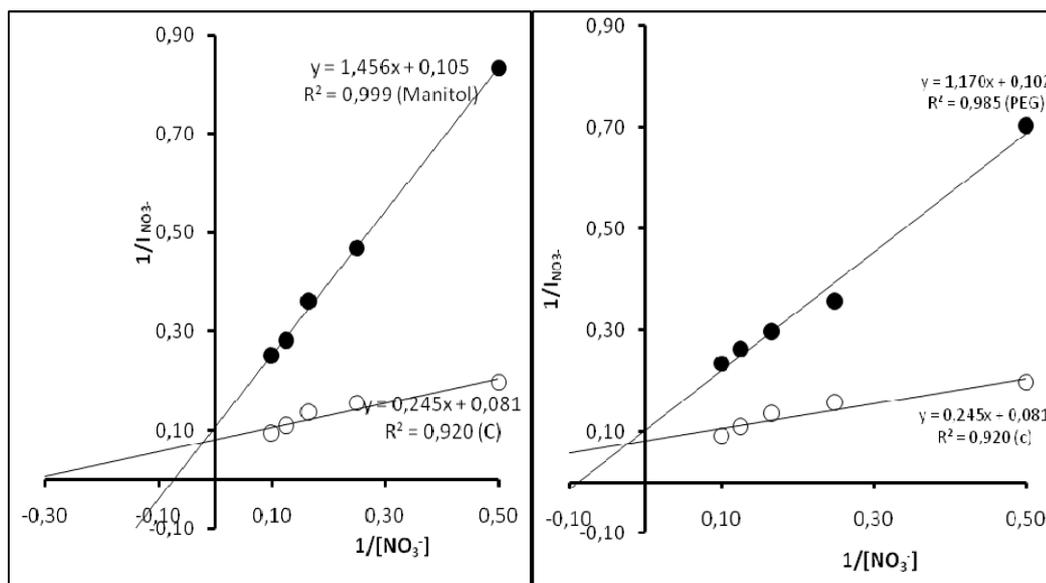


Figura 15: Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver- Burk) mostrando o tipo de inibição de dois agentes osmóticos: Manitol 100 mM (A) e PEG 17,84% (m/v) (B) na cinética de influxo de NO_3^- em sistema de baixa afinidade. As retas foram obtidas a partir dos dados originais de influxo e concentrações de nitrato. As constantes V_{\max} e K_m foram calculadas a partir das equações lineares.

Em sistema de alta afinidade, aplicaram-se somente dois agentes inibidores da absorção de NO_3^- : iônico (NaCl 100 mM) e osmótico (manitol 100 mM). Os dois agentes tiveram uma redução significativa do influxo de NO_3^- em relação ao controle (Tabela 10). O agente iônico NaCl reduziu progressivamente o influxo de NO_3^- em 42%. Porém, o efeito do manitol foi maior, reduzindo o influxo de NO_3^- em 61% em comparação ao controle (Tabela 11), indicando um comportamento iônico e osmótico na absorção de NO_3^- em alta afinidade de raízes de feijão-caupi (figura 16).

De acordo com as equações dos gráficos duplo-recíprocos de Lineweaver Burk na figura 17, percebe-se que as intercessões cruzaram em eixos diferentes. O tratamento NaCl 100 mM apresentou uma intercessão próxima ao eixo X e o manitol ao eixo Y. Estas duas verificações são típicas de inibições não-competitivas e competitivas, respectivamente (Lehninger, 1976). Os valores de K_m foram aumentados na presença dos dois inibidores. Entretanto, o V_{\max} estimado para o Manitol diminuiu em quase duas vezes em relação ao controle, mostrando-se um dado não característico de inibição

competitiva. Peuke & Jeschke (1999), em experimentos semelhantes, mostraram um aumento de K_m aparente do sistema de alta afinidade em plantas de cevada tratadas com 100 mM de NaCl. A inibição pelo NaCl causou uma diminuição de V_{max} , indicando uma inibição do tipo não-competitiva.

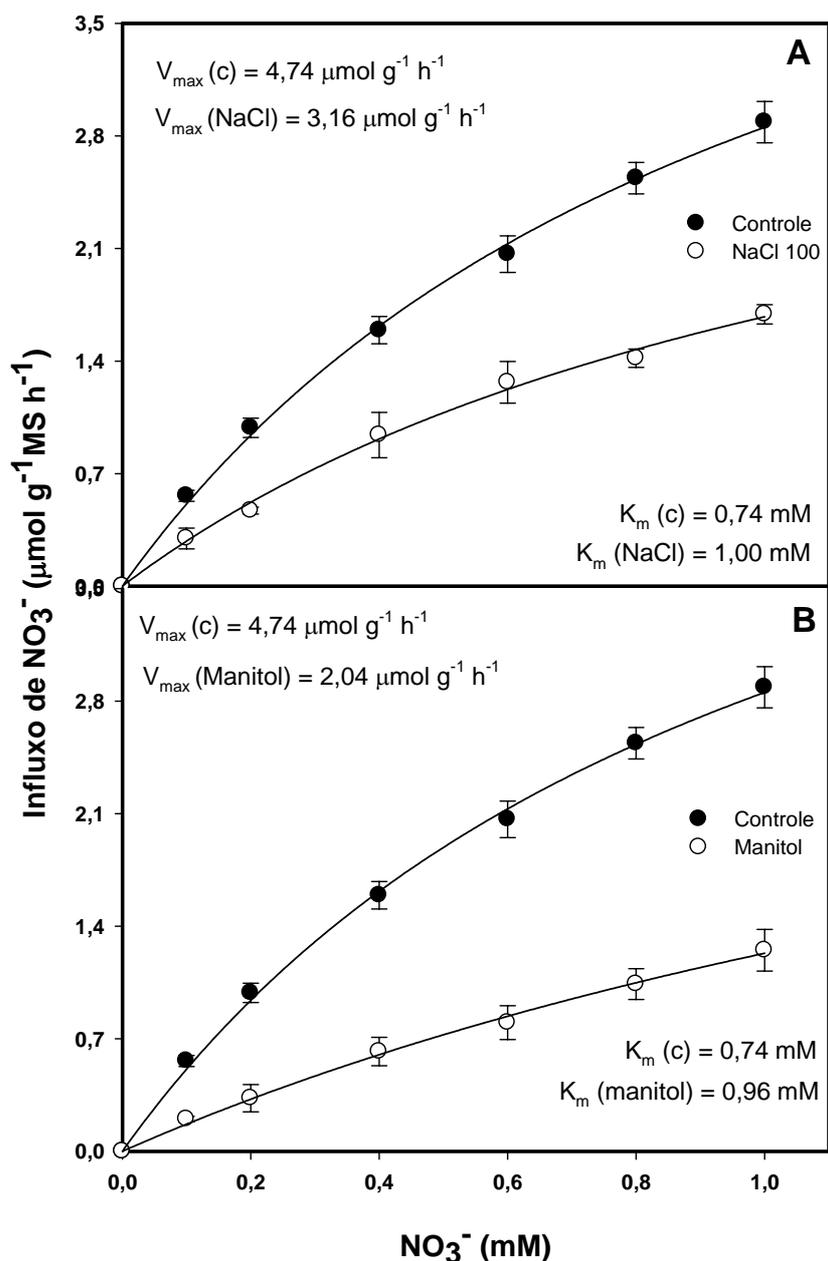


Figura 16: Efeito do NaCl 100 mM (A) e do manitol 100 mM (B) sobre a cinética de Influxo de nitrato em sistema de absorção de alta afinidade de raízes destacadas de feijão caupi. Os pontos e as barras representam médias e desvios padrões de quatro repetições. As constantes cinéticas $V_{m\acute{a}x}$ e K_m Est\~ao representadas por: controle (c), NaCl (NaCl) e manitol (manitol), respectivamente

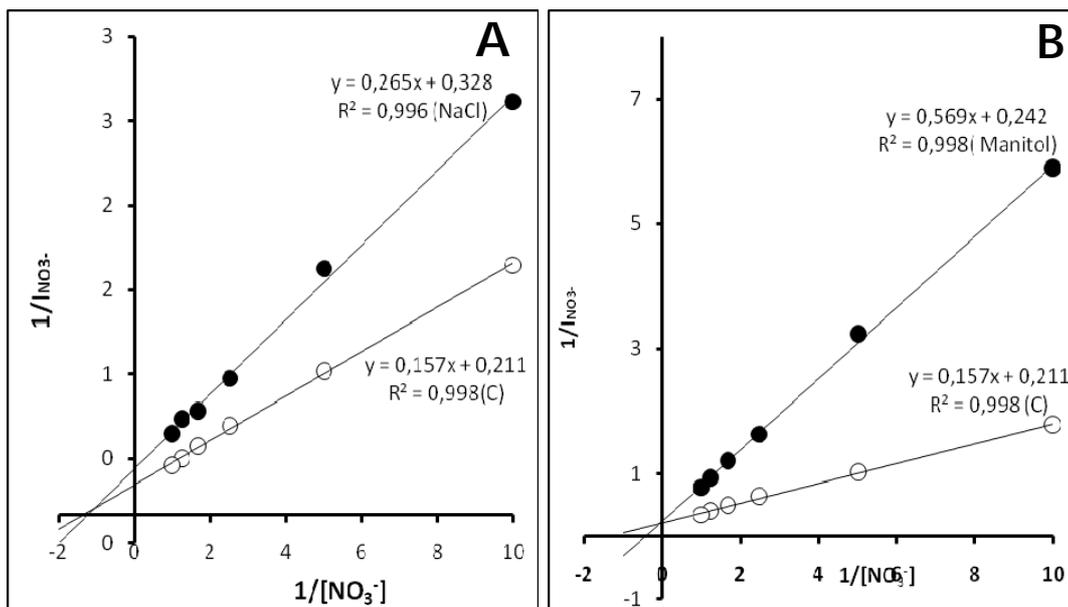


Figura 17: Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver- Burk) mostrando o tipo de inibição de dois agentes NaCl 100 mM(A) e Manitol 10 mM (B) na cinética de influxo de NO_3^- em sistema de alta afinidade. As retas foram obtidas a partir dos dados originais de influxo e concentrações de nitrato. As constantes V_{\max} e K_m foram calculadas a partir das equações lineares.

5.6 – Sínteses dos resultados e perspectivas futuras

1 – O processo de absorção de NO_3^- em raízes destacadas de feijão caupi na presença de NaCl é mais afetado pelo aumento do efluxo do que pela redução do influxo, especialmente nas raízes de plantas pré-tratadas com NaCl;

2 – Os resultados indicam que redução da absorção de NO_3^- pelo NaCl em raízes destacadas de feijão caupi não é causada por inibição competitiva com Cl^- ;

3 – Paradoxalmente, os agentes osmóticos PEG 6000 e Manitol causaram uma inibição muito próxima do tipo competitiva;

4 – Os efeitos dos sais KCl e Na_2SO_4 foram bastante diferentes entre si e o segundo mostrou um padrão inibitório semelhante ao do NaCl enquanto que o KCl mostrou um modelo bastante diferente do NaCl;

5 – Os efeitos dos agentes utilizados apresentaram a seguinte ordem inibição:
 Na_2SO_4 100 mM < NaCl 100 mM < KCl 100 mM = Manitol 100 mM = PEG 6000
17,84%.

6 – No conjunto, os dados mostram que os mecanismos de inibição do influxo de nitrato pela salinidade são muito complexos, envolvendo preponderantemente efeitos osmóticos, mas, em alguma extensão, componente iônica;

7 – Novos estudos são necessários envolvendo a fisiologia dos transportadores de nitrato com uso de inibidores específicos e expressão gênica. Em outra frente, elucidar os mecanismos endógenos de raízes e de parte aérea no controle do influxo de nitrato sob condições de estresse salino parece ser promissor.

VI – CONCLUSÃO

A salinidade causa redução na absorção líquida de NO_3^- em raízes de feijão caupi através de redução no influxo e aumento no efluxo. No influxo, ocorre uma inibição não-competitiva com o Cl^- , tanto no sistema de baixa como no de alta afinidade. Aparentemente, o componente osmótico é mais importante na inibição da absorção de nitrato, mas aparentemente o tipo de sal (íons) também interfere no processo.

VII – LITERATURA CITADA

ABD-EL Baki, SIEFRITZ G.K., F., MAN, H.M., Weiner, H., Kaldenhoff, R., Kaiser, W.M., Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. **Plant Cell Environ.** 23, 515–521, 2000.

ALLAKHVERDIEV, S.I., SAKAMOTO, A., NISHIYAMAMA, Y., INABA, M., MURATA, N., 2000b. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* 123, 1047–1056.

ALLARCÓN, J. J.; SÁNCHEZ BLANCO, M. J.; BOLARÍN, M. C. & TORRICELIS, A. Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. **Physiologia Plantarum**, 89: 441-447, 1993.

ASLAM, M.; TRAVIS, RL.; HUFFAKER, RC: Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley seedlings. *Plant Physiol*, 99:1 124-1 133.1992.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. A qualidade da água na agricultura. Campina Grande, UFPB, 1999. 153p.

ARAÚJO, J.P.P & WATT,E.E.(1988). **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA. Brasília-DF, p. 722.

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

ASLAM M, TRAVIS RL, RAINS WD: Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. **Plant Physiol** 1996, I 12:i 167-1 175.

AZEVEDO NETO, A.D. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos do estresse salino em plantas de milho**. 2005. 149 f. Tese de (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE. 2005. 149f.

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

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. *Plant, Cell & Environment* **28**:11, 1396–1409. 2005.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. **Trends in Plant Science**. v.11. p. 529-534. 2006.

BUTZ, R. G, JACKSON, W. A (1977). A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry*. 16: 409-417.

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.

CAWSE, P.A. The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. **Analyst**, v.9, n.2,p.309-313, 1967.

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

CEREZO, M.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; PRIMO-MILLO, E. Influence of Chloride and Transpiration on Net $^{15}\text{NO}_3^-$ Uptake Rate by *Citrus* Roots. **Annals of Botany**. V. 84, p. 117-120.

CRAMER, G. R.;ALBERICO, G. J.; SCHIMIDT. C. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. **Austrian Journal of Plant Physiology**, v. 21, p. 675-692, 1994

DANIEL-VEDELE F, FILLEUR S, CABOCHE M. Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr. Opin. Plant Biol.*1:235–39. 1998

DANTAS, J.P.; MARINHO, F. J. L.; FERREIRA, M.M.M.; AMORIM,M.S.N.; ANDRADE, S.I.O.; SALES, A.L. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n.3, p.425-430, 2002.

DAKER, A. A água na agricultura; manual de hidráulica agrícola. 7.ed. Rio de Janeiro, RJ: Freitas Bastos, 1988. 543p.

DEANNE-DRUMMOND, C.E. Biochemical and biophysical aspects of nitrate uptake and its regulation. In: ABROL. Y.P. **Nitrogen in higher plants**, Somerset: Research Studies, 1990, p. 1-37.

DEBOUBA,M.; GOUIA, H, SUZUKI, A.; GHORBEL, M.H (2006) NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato "*Lycopersicon esculentum*" seedlings. *J Plant Physiol* 163:1247–1258.

DEBOUBA, M.; MAAROUFI-DGHIMI, BH.; 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**. 99. 1143-1151. 2007.

DENG, M.D.; MOUREAUX, T.; CHEREL, I.; BOUTIN, J.P & CABOCHE, M. effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. **Plant Physiol. Biochem.**, 29:239-247, 1991.

DIATLOFF E, ROBERTS M, SANDERS D, ROBERTS SK (2004). Characterization of anion channels in the plasma membrane of Arabidopsis epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* 136: 4136–4149

EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas**; princípios e perspectivas. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos, 1975. 341p.

FAGERIA, N.K.; GHEYI, H.R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: Simpósio: Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura Irrigada. Campina Grande: UFPB, 1997. p.363-383.

FAO, 2000. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils, available on: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm> (accessed May 10 2008).

FAO. Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils.2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>>. Acesso em: 31 de Julho de 2007

FERREIRA-SILVA, S.L., SILVEIRA, J.A.G., VOIGT, E.L. Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. *Braz. J. Plant Physiol.*, Jan./Mar. 2008, vol.20, no.1, p.51-59.

FORDE BG. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochim. Biophys. Acta** 1465:219–35. 2000.

FREIRE-FILHO, F.R.(1988). origem, evolução e domesticação do caupi. **In: ARÚJO, J.P.P de & WATT, E.E(eds.) o caupi no Brasil**.p.p. 27-46. Brasília: IITA/EMBRAPA.

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

GALVÁN A, FERNÁNDEZ E. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell. Mol.Life Sci.* 58:225–33. 2001.

GHEYI, H.R. Problemas de salinidade na agricultura irrigada. In: Oliveira, T.S.; Assis Jr.,R.N.; Romero, R.E.; Silva, J.R.C. (eds). Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2000. p.329-346.

GLASS ADM, BRITO DT, KAISER BN, KRONZUCKER HJ, KUMAR A. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. *Z. Pflanz. Bodenk.* 164:199– 207. 2001.

GLASS ADW, SIDDIQUI MY: Nitrogen absorption by plant roots. In Nitrogen Nutrition in *Higher Plants*. Edited by Srivastava HS, Singh RP. New Dehli: Associate Publishers; .21-56. 1995

GOJON A, DAPOIGNY L, LEJAY L, TILLARD P, RUFTY TW. Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on 15NO_3^- uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant Cell Environ.* 21:43–53. 1998.

GOUIA, H.; GHORBAL, M. H. & TOURAINE, B. Effects of NaCl on Flows of N and Mineral Ions and on NO_3^- - Reductase Rate within Whole Plants of Salt-Sensitive Bean and Salt-Tolerant Cotton. *Plant Physiology*, 105:1409-1418, 1994.

GREENWAY, H. & MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31:149-190, 1980.

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

HOLANDA, J. P.; AMORIM, J.R.A. Qualidade de água para irrigação. In: GHEYI, H.R.; QUEIROZ, J.E.; MEDEIROS, J.M. (ed.) **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB-SBEA, 1997. p.137-169.

KAISER, W.M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. Acid-base modulation of nitrate reductase in leaf tissues. *Plant*, v.196, p 1-6, 1995.

LEA, P.J. Nitrogen Metabolism. **IN: PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (LEA, P.J & LEEGOOD, R.C. EDS.)** Jonh Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England.. p155-180. 1993.

LEA. P.J. Primary Nitrogen Metabolism. **IN: PLANT BIOCHEMISTRY (DEY, P.M & HARBORNE, J.B EDS.)** p. 273-306. 1997.

LEHNINGER. A.L.; Bioquímica. Componentes Moleculares das Células. V.1.São Paulo: Edgard Blucher, 1976.

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.

KING BJ, SIDDIQUI MY, RUTH T, WARNER RL, GLASS AD: Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiol* 1993, 102:1279-1286.

KUIPER, P.J.C. Functioning of plants cells membranes under saline conditions: membrane lipid composition and ATPases. In: Staples, R.C.; Toenniessen, G.H. (eds.) Salinity tolerance in plants. New York: Willey, 1984. p.77-91. - Larcher, W. Ecofisiologia vegetal. São Carlos: Ed. Rima Artes e Textos, 2000. 531p.

LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; RUIZ, H.A.; PRISCO, J.T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, Paris, v.49, n.2, p.107-120, 2003.

LIMA, C.J.G.S.; OLIVEIRA, F.A.; MEDIEROS, J.F.; OLIVEIRA, M.K.T.; JUNIOR, A.B.A. Resposta do feijão caupi a salinidade da água de irrigação. **Revista Verde** v.2, n.2, p. 79–86. 2007.

MACKOWN, C.T, JACKSON, W. A, VOLK, R. J.; (1983). Partition of previously accumulated nitrate to translocation, reduction and efflux in corn roots. *Planta* 157:8-14

MARÉCHAL, R.; MACHERPA, J.M & STAINER, F. (1988) Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et poliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissira**. **28**: 273, 1978 apud FREIRE-FILHO.

MARTINS-MIRANDA, A. S. **Atividade de enzimas relacionadas com estresses biótico e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] expostas à salinidade e deficiência hídrica**. 2002. 85 f, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. London: Academy Press, 1995. 889p.

MEDEIROS, J.F. de; GHEYI, H.R. Manejo do sistema solo-águaplanta em solos afetados por sais. In: GHEYI, H.R.; QUEIROZ, J.E.; MEDEIROS, J.M. (ed.) Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997. p. 239-288.

MELO, A.R.B. Utilização de Nitrato e Ajustamento Osmótico em Plantas de Feijão-de-Corda Submetidas a Diferentes Níveis de Salinidade. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 1999. 164p. Tese de Doutorado.

MILLER, A.J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S.J.; WELLS, D.M. Nitrate transport and signaling. *Journal of Experimental Botany*, v. 25, 883-891, 2007.

MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v.274, p1,36, 2004.

MILLER, A.J, SMITH, S.J (1996) Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J Exp Bot* 47: 843±854

MORAIS, D.; VIÉGAS, R.A.; SILVA, L.M.M.; LIMA JR, A.R.; COSTA, R.C.L.; ROCHA, I.M.A.; SILVEIRA, J.A.G. Acumulação de íons e metabolismo de N em cajueiro anão em meio salino. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental. V.11. p. 125-133. 2007.

MORGAN. M. A.; VOLK. R. J.; (1973). Simultaneous influx and efflux of nitrate of nitrate by corn roots during uptake by perennial ryegrass. **Plant physiol.** 51:267-272.

MORGAN, M.A.; JACKSON, W. A.; VOLK, R. J. (1985). Uptake and assimilation of nitrate by corn roots during and after induction of the nitrate uptake system. **J Exp. Bot** 36: 859-869.

MORTVEDT, J.J.; MURPHY, L.S.; FOLLETT, R.H. **Fertilizer technology and application.** Ohio: Meister Publ., 1999. 199 p.

MOYA, J.L.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Morphological factors determining salt tolerance in *citrus* seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant, Cell and Environment*, Logan, v.22, n.11, p.1425-1433, 1999.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, Logan, v.25, n.2, p.239-250, 2002.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bring them together. *New Phytologist*, New York, v. 143, n.3, p.645-663, 2005.

MUNNS R, TESTER M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* (in press).

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

PARIDA, A.K., DIAS, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60 324–349 *J. Plant Physiol.* 161, 921–928.

PEUKE, A.D.; JESCHKE, W.D. The characterization of inhibition of net nitrate uptake by salt in salt-tolerance barley (*Hordeum vulgare* L.cv. California Mariout). *Journal Experimental Botany*. 50. P. 1365-1372. 1999.

PILBEAM, D.J. & KIRBY, E.A. The Physiology of Nitrate Uptake. In: ABROL, Y.P. ed. Nitrogen Higher Plants. Somerset, England, Research, Studies, p.39-64, 1990.

PINTO, V.P.T. Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* das frações albumina e globulina de oito cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Fortaleza: UFC, 1998. 88p. Dissertação Mestrado.

RENGASAMY P. 2002. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. Australian Journal of Experimental Agriculture 42, 351–361.

RICHARDS, L. A. Suelos salinos y sodicos; diagnostico y rehabilitacion. 6.ed. México: Editorial Limusa, 1974. 172p.

SCHEIBLE WR, GONZALES-FONTES A, LAUERER M, MULLER-ROBER B, CABOCHE M, STITT M: Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch etabolism in tobacco. Plant Cell 1997, 9:1-17.

SERRAJ. R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v.25, p. 333-341,2002.

SILVEIRA, J.A.G & CROCOMO, O.J. assimilação de nitrogênio: Implicações enrgéticas. In: **ANAIS DO III SEMINÁRIO DE BIOTECNLOGIA AGRÍCOLA (CROCOMO ET AL(EDS.)). USP-ESALQ-CEBTEC/FEALQ. Piracicaba-SP. p. 265-295. 1985.**

SILVEIRA, J.A.G.; MELO, A.R.B & VIEGAS, R.A. Salt-induced decrease on nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11(2), 1999.

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.

SMITH, R. J. & GALLON, J. R. Nitrogen Fixation. In: **PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (LEA, P.J & LEEGOOD, R.C. EDS.)** John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England. pp. 129-153. 1993.

STOREY, R., Salt tolerance, ion relations and the effect of root medium on the response of citrus to salinity. *Australian Journal Plant Physiology*, Collingwood, v.22, n.1, p.101-114, 1995.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advances in Physiology Education**, v. 28p. 155-159, 2004.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology, Tradução de SATARÉM, E. R. et al. E.ed. Porto Alegre, RS: ARTMED, 2004. 719p.

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

TURK, K.J. & HALL, A.E. (1980b). Drought adaptation of cowpea. II. Influence of drought on plant yield. **Agronomy Journal** 72: 421-427.

VIEGAS,R.A.; MELO, A.R.B, SILVEIRA, JAG. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale* L.) in response to salt (NaCl) shock. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 11: 21–28. 1999.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N M. **Testes de vigor de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

VOET, Donald; VOET, Judith G & PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de bioquímica**. Art Med, 2000.

VON WÍREN, N., LAUTER, F.-R., NINNEMANN, O., GILLISSEN, B., WALCH-LIU, P., ENGELS, C., JOST, W. and FROMMER, W.B. (2000) Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J.* 21: 167–175.

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.

YOKOI, S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Salt stress tolerance of plants. In: IWANAGA, M (Ed). **JIRCAS Working Report n° 23**. Tsukuba: Japan International Research Center For Agricultural Sciences. P. 25-33, 2002.

ZINGARELLI, L.; MARRÈ, M.T.; MASSARDI, F.; LADO, PIERA. Effects of hyperosmotic stress on K^+ fluxes, H^+ extrusion, transmembrane electric potential difference and comparison with the effects of fusicoccin. *Physiologia plantarum*. 106: 287-295, 1999.